

Série : A, n° 856

N° d'ordre :
882

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION SCIENCES)

PAR

JACQUES CLOSON

DOCTEUR EN MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LIÈGE

1^{re} THÈSE : RECHERCHES SUR LA SULFOCONJUGAISON DES HORMONES
THYROÏDIENNES.

2^{me} THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 25 avril 1959 devant la Commission d'Examen.

MM. R. WURMSER *Président.*

A. JOST

E. LEDERER

J. ROCHE

} *Examineurs.*

} *Invité.*

IMPRIMERIE DEROUAUX

LIÈGE - BELGIQUE

1959

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION SCIENCES)

PAR

JACQUES CLOSON

DOCTEUR EN MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LIÈGE

1^{re} THÈSE : RECHERCHES SUR LA SULFOCONJUGAISON DES HORMONES
THYROÏDIENNES.

2^{me} THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 25 avril 1959 devant la Commission d'Examen.

MM. R. WURMSER *Président.*

A. JOST

E. LEDERER

J. ROCHE

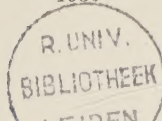
} *Examineurs.*

Invité.

Imprimerie DEROUAUX

LIÈGE-BELGIQUE

1959





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554027_0010

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

P R O F E S S E U R S

Doyen J. PERES

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure
FOCH	T Mécan. physique et expérimentale
DE BROGLIE	T Théories physiques
PRENANT	T Anatomie et Histol. comparées
PERES	T Mécan. des Fluides et applications
M. CURIE	T Physique (S.P.C.N.)
BARRABE	T Géol. struct. et Géol. appliquée
J. BOURCART	T Géogr. physique et Géol. dynamique
PLANTEFOL	T Botanique
GRASSE	T Evolution des êtres organisés
PREVOST	T Chimie organique
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie
CHAUDRON	T Chimie appliquée
WYART	T Minéralogie
TEISSIER	T Zoologie
MANGENOT	T Biol. Végétale
P. AUGER	T Physique quantique et relativité
MONNIER	T Physiol. générale
PIVETEAU	T Paléontologie
ROCARD	T Physique (E.N.S.)
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T Chimie générale
FAVARD	T Géométrie supérieure
COULOMB	T Physique du Globe
M ^{le} COUSIN	T Biol. animale (S.C.P.N.)
CHRETIEN	T Chimie minérale
P. DRACH	T Zoologie
KASTLER	T Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T Génétique
WURMSER	T Biologie physico-chimique
RIVIERE	T Géologie (S.P.C.N.)
GAUTHERET	T Biol. végétale (P.C.B.)
LUCAS	T Recherches physiques
A. THOMAS	T Biologie cellulaire
ARNULF	T Optique appliquée
M. MORAND	T Enseignement de Physique
SOLEILLET	T Physique
FORTIER	T Mécanique expérim. des fluides
DANJON	T Astronomie
LAPORTE	T Physique générale et Radioactivité
JANET	T Mécanique analytique et Mécanique céleste
PETIT	T Biologie maritime
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique

GALLIEN	T Embryologie
EICHHORN	T Biologie Végétale (S.P.C.N.)
DE CUGNAC	T Biologie Végétale (S.P.C.N.)
M ^{le} CAUCHOIS	T Chimie Physique
THELLIER	T Physique du Globe
L'HERITIER	T Génétique
GRIVET	T Radioélectricité
PONCIN	T Mécanique Générale
DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres
QUELET	T Chimie organique
CAGNIARD	T Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T Géol. structurale et Géologie appliquée
JUNG	T Pétrographie
TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T Chimie organique et structurale
JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste
VASSY	T Physique de l'Atmosphère
DESTOUCHES	T Théories physiques
M. PRUVOST	T Géologie
AMIEL	T Chimie générale (P.C.B.)
HOCART	T Minéralogie
J.P. MATHIEU	T Physique (P.C.B.)
COUTEAUX	T Biol. Animale (P.C.B.)
MAY	T Biol. Animale (P.C.B.)
CHOQUET	T Calcul différentiel et Intégral
FELDMANN	T Biologie (P.C.B.)
GUINIER	T Physique des solides
JOST	T Physiol. comparée
FORTET	T Calcul des probabilités
SCHWARTZ	T Calcul différentiel et Intégral
CHOUARD	T Physiol. Végétale
MALAVARD	T Aviation
BRELOT	T Calcul différentiel
NORMANT	T Chimie organique
BENARD	T Chimie minérale
BUVAT	T Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T Statistiques mathém.
GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.)
SOULAIRAC	T Psychophysiologie
ULRICH	T Physiologie Végétale
MARECHAL	T Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T Théories chimiques
CHADEFAUD	T Botanique
DESTRIAU	T Physique (M.P.C.)
M ^{le} LE BRETON	T Physiol. générale
SALEM	T Mathématiques Générales
LELONG	T Mathématiques Générales
DEVILLERS	Anatomie et Histologie comparées
EHRESMANN	T Topologie algébrique
FRANÇON	T Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T Géogr. physique et Géol. dynamique

GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T Calcul des Probabil.
ROCH E.	T Géologie
SCHATZMANN	Astrophysique
TERMIER	T Paléontologie stratigraphique
ZAMANSKY	T Mathématiques Génér.
LENNUIER	Physique (M.G.P.)
RIZET	Génétique
ROUTHIER	Géologie Appliquée
Mme TONNELAT	T Théories physiques
DIXMIER	T Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T Chimie générale
AIGRAIN	T Electrotechnique
BRUSSET	Chimie minérale
M. LEVY	Physique théorique
Mme CHAIX	Chimie biologique
Mme HUREL-PY	Biol. Végétale (P.C.B.)
PIAUX	Chimie (P.C.B.)
BRUN	Mécanique expérimentale des fluides
LEDERER	T Chimie des substances organiques naturelles
Mme DUBREIL	T Mathématiques
Mme LELONG	T Mathématiques (E.N.S.)
BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.)
COTTE	T Physique (M.P.C.)
DUBOIS J.E.	T Chimie (S.P.C.N.)
LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.)
LE ROLLAND	Mécan. des fluides
MICHEL André	T Chimie (S.P.C.N.)
OLMER	T Energétique Générale
ROUAULT	T Physique Générale
GAUTHIER	T Méc. appliquée
BARCHEWITZ	Chimie Physique
BROSSEL	Physique atomique
BUSER	Biologie animale (P.C.B.)
CAMUS	Biol. Vég. (P.C.B.)
CASTAING	Physique Générale
CURIEN	Minéralogie et cristallographie
MOYSE	Physiologie Végétale
NOIROT	Evolution des êtres organisés
PANNETIER	Chimie (S.P.C.N.)
POSSOMPES	Biologie Animale (P.C.B.)
PULLMANN	Chimie Théorique
TEILLAC	Physique Nucléaire et Radioactivité
TONNELAT	Biol. physico-chimique
VILLE	Econométrie
WILLEMART	Chimie (P.C.B.)
DODE	T Chimie
FREYMANN	T Physique (S.P.C.N.)
GUINOCHE	T Biol. Vég. (ORSAY)
ROLLET	T Chimie (P.C.B.)
Mle JOSIEN	T Chimie (P.C.B.)
CHEVALLEY	T Géométrie Algébrique et théorie des groupes

ARNOULT	T Physique (Orsay)
CHAPELLE	T Physique (P.C.B.)
DELANGE	T Mathématiques (Orsay)
DENY	T Mathématiques (Orsay)
GERMAIN P.	T Méc. théor. des fluides
LUCAS G.	T Géologie

SECRETAIRE GENERAL C. MONIER

Recherches sur la Sulfoconjugaison des Hormones Thyroïdiennes

PAR

JACQUES CLOSON

Travail du Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée du Collège de France,
sous la direction de Monsieur le Professeur Jean ROCHE.

A la mémoire de ma Grand-Mère

Madame CLOSON,

née Marie-Louise MARCHAND.

*A Monsieur Jean ROCHE,
Professeur au Collège de France;*

A mes amis

*Monsieur Raymond MICHEL,
Professeur de Chimie Pharmaceutique,
et Madame Raymond MICHEL,
Assistante au Collège de France.*

*

*A mes Maîtres de la Faculté de Médecine
de l'Université de Liège, et tout
particulièrement*

*à Monsieur Paul DESAIVE,
Directeur du Centre Anticancéreux
près la dite Université,
et à Monsieur Zénon-M. BACQ.*

*

*A Messieurs les Professeurs de la
Faculté des Sciences de l'Université
de Paris, membres de mon jury de thèse.*

*

*A mes Collègues et Amis du Laboratoire
de Biochimie Générale et Comparée du
Collège de France.*

*

*Ce travail a été réalisé grâce aux
bourses de recherches qui m'ont été
allouées par*

- la Commission Administrative du
Patrimoine de l'Université de Liège,*
- la Commission pour l'application de
l'Accord Culturel franco-belge,*
- le Conseil d'Administration de la
Fondation de Monsieur et Madame
BRACONIER-LAMARCHE de Liège:*

*je leur exprime toute ma très cordiale
reconnaissance.*

*

INTRODUCTION GENERALE

Introduite fin du siècle dernier, la biochimie thyroïdienne s'est développée principalement à partir de 1939-1940 grâce à l'emploi des isotopes radioactifs de l'iode (58, 73, 80, 81, 101, 102). A cette époque étaient connues : la fonction endocrine de la thyroïde (66, 88, 187), sa capacité de concentrer les iodures (9, 66, 124, 187) qui lui confère une richesse exceptionnelle en iode (9, 66, 187) et l'incorporation de celui-ci dans une protéine particulière des vésicules de la glande (72; 124), la thyroglobuline dont les caractéristiques ont été ultérieurement précisées (11, 28, 29, 36, 75, 93, 155, 163, 164, 220). Deux acides aminés avaient été extraits de cette protéine et leur structure était établie : l'acide 3,5-diiodo-L-4-hydroxyphenyl- α -aminopropionique ou 3,5-diiodo-L-tyrosine (DIT) (63, 64, 66) et l'isomère lévogyre de l'éther parahydroxyphénilique de la tyrosine (ou L-thyronine), tétra-iodé en 3,5,3',5' et appelé thyroxine (T_4) (60, 61, 62, 65, 66, 84, 85, 87). L'un et l'autre renferment respectivement 60 et 30 % (22, 115, 146, 217) environ de l'iode thyroglobulinique total. T_4 capable de supprimer le syndrome consécutif à la thyroïdectomie (88, 187, 221) a été longtemps considéré comme le seul principe actif de la glande et l'hormone circulante sécrétée par elle dans le sang, paraissait être un polypeptide de faible poids moléculaire dont T_4 était l'un des acides aminés constitutifs (66, 67, 69, 187). La coexistence de DIT et de T_4 dans la thyroglobuline et leurs proportions relatives permettait d'envisager le premier comme étant le précurseur du second : deux molécules de DIT, par condensation oxydative formant une molécule de T_4 avec élimination d'acide pyruvique et d'ammoniaque (63, 64, 66, 68, 102, 126, 127). Cette théorie devait être confirmée par des essais de condensation de DIT in vitro (123, 127) et par les résultats de l'analyse des produits de l'ioduration artificielle des protéines (89, 109, 133, 157) et surtout par l'identification d'autres acides aminés iodés dans la thyroglobuline (21, 69, 115, 146, 152, 169) découverte rendue possible grâce à l'utilisation du radioiode et à l'introduction, vers 1944, de la chromatographie sur papier en chimie analytique (24).

L'administration d'iodures radio-actifs traceurs c'est-à-dire en quantité négligeable par rapport au taux normal de ce sel dans l'organisme, fait apparaître en quelques heures dans la thyroïde une thyroglobuline marquée que l'on peut extraire, purifier et hydrolyser (28, 29, 115, 155). Cette dernière opération libère les acides aminés constitutifs de la protéine dont les dérivés iodés sont marqués et dès lors peuvent être reconnus et identifiés quelque faible qu'en soit leur concentration. C'est entre autre ainsi qu'en 1948 (36, 200, 201) un nouvel iodo-aminoacide thyroglobulinique était caractérisé : la 3-monoiodo-L-tyrosine (MIT) qui représente environ 10 % de l'iode total de la protéine thyroïdienne (22, 115, 146, 200).

Par un mécanisme de condensation semblable à celui proposé pour la biosynthèse de T_4 , une molécule de DIT et une de MIT ou deux molécules de MIT pouvaient donc produire des iodothyronines di- et triiodées dans la glande (152). Confirmant cette hypothèse, en 1952 on isolait de la thyroglobuline et on caractérisait la 3,3,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) (55, 147, 148, 152) qui par ailleurs avait été synthétisée (55). Cette nouvelle iodothyronine beaucoup moins abondante que T_4 en possède toutes les activités biologiques (23, 34, 54, 55, 117, 118, 128, 180) mais à dose équimoléculaire est 5 à 10 fois plus active qu'elle. Trois ans plus tard, l'existence de deux autres iodothyronines dans la thyroïde du Rat et dans celle du Porc était établie. Il s'agissait de la 3,3',5'-triiodothyronine (T_3) et de la 3,3'-diiodothyronine (T_2) (167, 168, 169, 171, 184) toutes deux possédant aussi - quoique à un degré moindre - certaines activités analogues à celles de T_4 (162, 180). On pouvait dès lors se demander si ces iodothyronines nouvellement identifiées étaient des hormones. Effectivement, de même que T_4 elles existent dans la thyroïde en petites quantités à l'état libre (171) avec d'autres aminoacides (115, 217), comme produits de l'hydrolyse physiologique de la thyroglobuline (142, 143, 144), processus nécessaire à la sécrétion hormonale de la glande (115, 144). Il apparaissait donc vraisemblable que ces quatre iodothyronines soient déversées dans la circulation. Effectivement, après administration d'iodures radio-actifs traceurs, la thyroïde secrète dans le sang des produits marqués liés aux protéines (112, 131, 141) en presque totalité (141) mais extractibles par le butanol (96, 113) ou l'alcool ammoniacal (170, 172). Dans de tels extraits, T_4 est le constituant principal (7, 31, 51, 185, 94, 199, 202, 206) accompagné de T_3 (31, 53, 206) et - chez le Rat du moins - de T_2 et T'_3 (170, 172) ainsi que d'autres produits iodés métabolites des premiers et dont nous parlerons plus loin. L'hypothèse sur la présence de polypeptides iodés sanguins de nature hormonale, a donc du être abandonnée.

Par ailleurs en 1955, on démontrait après injection de ^{131}INa , la présence de T_4 et de T_3 marquées en quantité plus importante dans le sang des veines thyroïdiennes que dans celui afférant à la glande (206), preuve directe de la sécrétion de ces iodothyronines. Semblable démonstration n'a pas été apportée pour T'_3 et T_2 , mais dans l'expérience précitée, les solvants chromatographiques utilisés ne permettaient pas de les distinguer de T_4 (170, 172, 207). Leur nature hormonale chez le Rat peut néanmoins être considérée comme certaine (116, 169, 170, 171, 172).

En conclusion, depuis ces dernières années, on admet que la thyroïde secrète quatre hormones, iodothyronines tétra- tri- et diiodées. L'étude de leur métabolisme était devenue possible grâce à l'utilisation de ces hormones marquées par le radioiode soit par voie biologique, soit chimique et dans cette seconde éventualité possédant des radioactivités spécifiques suffisamment élevées (166) pour permettre ces recherches dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire après leur introduction dans l'organisme à dose infime ne troublant en rien les équilibres métaboliques normaux. L'administration d'hormones thyroïdiennes ainsi marquées est suivie d'une excrétion radioactive fécale et urinaire importante. La première est constituée essentiellement de dérivés organiques

de l'iodothyronine injectée (56, 116, 204, 205), la seconde renferme surtout des iodures (37, 41, 56, 116, 205) témoins d'une première voie métabolique de ces hormones : la déshalogénéation. On a montré qu'il s'agissait d'un processus enzymatique (194, 196) s'opérant principalement dans le foie (39, 40, 41, 110) mais également dans le rein (194, 196) et dans d'autres tissus (38, 39, 40, 149), avec des vitesses croissantes quand on passe de T_4 à T_3 et surtout à T_3^1 et T_2 (35, 41, 56, 83, 178, 179, 195). Cette désioduration hormonale, en particulier en ce qui concerne T_4 sécrétée en plus grande quantité par la thyroïde, est susceptible de donner naissance à des iodothyronines moins halogénées (2, 38, 43, 44, 52, 57, 82, 97, 100, 111, 173, 175). Dès lors on pouvait envisager pour celles-ci une double origine thyroïdienne d'une part, et périphérique par dégradation de T_4 , d'autre part. Cette dernière éventualité ne peut cependant être retenue pour expliquer la présence de T_3^1 et T_2 dans le sang car ces deux hormones sont totalement déshalogénées quelques heures à peine après leur injection veineuse (35, 195), mais ceci n'exclut pas la possibilité de leur formation intracellulaire à partir de T_4 (57, 159) et leur utilisation immédiate par la cellule.

L'étude de la distribution de la radioactivité aux différents organes et tissus de l'animal après injection de l'une ou l'autre des quatre hormones marquées, a attiré l'attention sur le foie qui les concentre vite et intensément (1, 56, 86, 130, 132, 174, 178) pour donner lieu à une sécrétion radioactive biliaire importante (86, 116, 156, 178, 179, 205). L'analyse chromatographique de cette dernière a permis au cours de ces dernières années, de préciser deux autres processus métaboliques des hormones thyroïdiennes. La conjugaison hépatique de T_4 avec l'acide glycuronique a tout d'abord été démontrée par l'analyse des produits biliaires radioactifs chez l'animal injecté de doses physiologiques de T_4 marqués par ^{131}I (154, 161, 203, 204, 205). Elle a été confirmée au moyen d'hormone marquée d'origine endogène chez l'animal ayant reçu ^{131}INa (205) et in vitro, au moyen de foie perfusé (16, 204, 205) ou de coupes de cet organe incubées en présence de l'hormone marquée (16, 204, 205). Elle s'opère au niveau de l'-OH phénolique de la thyronine (205) et nécessite d'une part un donneur d'acide glycuronique qui a été identifié à l'acide uridine-diphosphate-glycuronique et d'autre part la présence d'une glycuronosyltransférase (78, 79). Cette glycuroconjugaison surtout importante dans le foie s'effectue également mais à un moindre degré en l'absence de celui-ci, dans les reins (16) et dans divers autres tissus (38, 39, 40, 52, 204). On a montré que ce processus était commun aux quatre hormones (153, 154, 156, 158, 178, 179) mais avait une importance quantitative moindre dans le cas de celles tri-et diiodées probablement en raison de leur catabolisme beaucoup plus rapide.

La quantité de glycuroconjugué biliaire est apparue fonction - dans certaines limites - du taux de l'hormonémie (156, 205); le produit est sécrété par le foie plus rapidement que l'hormone elle-même (205) et, déversé dans l'intestin, il se résorbe moins que son précurseur (17, 205). Par ailleurs, dans des conditions normales, le glycuroconjugué n'apparaît qu'à l'état de traces dans le sang (7, 57, 156). Il s'agit donc d'un processus de détoxication régulateur de l'hormonémie et il a été démontré qu'il s'effectue avec économie d'hormone. En effet, le

glycuroconjugué au niveau du gros intestin est partiellement hydrolysé par la β -glycuronidase des bactéries et l'hormone ainsi régénérée est résorbée et entre dans un circuit entérohépatique (15, 17, 103, 156, 178, 179, 205) constituant une véritable réserve hormonale. Mais, le glycuroconjugué n'est pas le seul produit métabolique des iodothyronines excrété par la bile : il est accompagné de quantités variables d'hormone inchangée, d'un faible pourcentage d'iodures et d'autres dérivés organiques que le perfectionnement progressif des méthodes analytiques devait permettre d'identifier en partie du moins.

L'acide 3,5,3',5'-tétraiodothyropyruvique a été isolé en petite quantité dans la bile du Rat traité par T_4 (160, 161) et, chez cet animal on l'a retrouvé également dans les urines (160). Il en est de même de son homologue triiodé en 3,5,3'-identifié dans les produits d'excrétion de l'animal injecté d'une dose physiologique de T_3 (158). Par ailleurs un des métabolites biliaires de T_3 et de T_2 semble pouvoir être le dérivé pyruvique correspondant à ces deux hormones (116, 174, 178). La formation d'acides α -cétoniques dérivés des iodothyronines montre que celles-ci, subissent une désamination oxydative, au même titre que les autres acides aminés. Ce processus catabolique - d'intensité variable suivant l'hormone en cause - nécessite soit l'intervention d'une L-aminoacidoxydase, soit une transamination suivie d'une oxydation comme c'est le cas pour la formation d'acide 3,5-diiodo-4-hydroxyphenylpyruvique à partir de la 3,5-diiodo-L-tyrosine (218) : mais les deux mécanismes semblent possibles (161, 177).

Ces faits établis, on pouvait se demander si cette désamination oxydative des iodothyronines correspondait à un type hépatique ou à un processus général de leur catabolisme, et il importait de le préciser par l'identification de leurs métabolites dans d'autres tissus.

Peu de temps après l'injection de T_3 marquée, on a isolé et identifié dans les muscles et les reins l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA_3) accompagné d'iodures de T_2 et d'autres produits non caractérisés (173, 175, 177). De même après injection de T_2 , on a pu isoler du rein, l'acide 3,3'-diiodothyroacétique (TA_2) (182). Or, ces dérivés acétiques ne se retrouvent pratiquement pas dans le sang (7, 40, 43, 57, 156, 202, 206); on pouvait dès lors admettre leur formation sur place dans les cellules des tissus considérés. Effectivement on a pu réaliser semblable décarboxylation oxydative en incubant des coupes de rein frais en présence d'hormone (95) et observer que des mitochondries rénales traitées par ultra-sons, libéraient un système enzymatique oxydant T_4 et T_3 respectivement en TA_4 et TA_3 (4, 95) dont les précurseurs paraissent bien être les acides iodothyropyruviques correspondants (216). On a également rapporté que des coupes de muscles, de rein et de cerveau incubées en présence de T_4 métabolisaient cette dernière avec formation de TA_4 ou d'acide tétraiodothyropropionique, de T_3 et de TA_3 ou d'acide 3,5,3'-triiodothyropropionique (198).

La désamination oxydative des iodothyronines est donc un processus métabolique général de celles-ci, elle est suivie d'une décarboxylation oxydative, processus dont l'importance quantitative a pu être évaluée indirectement par mesure du $^{14}CO_2$ exhalé chez des animaux traités par T_4 - $1-^{14}C$ (91).

Les étapes ultérieures du catabolisme des iodothyronines ne sont pas connues mais comportent peut-être la déshalogénéation totale du dérivé et la rupture du pont éther entre les deux anneaux benzéniques (108). L'observation bien connue du temps de latence d'une dizaine d'heures (221) entre l'administration de T_4 et l'apparition de ses effets sur la consommation d'oxygène des tissus, suggérerait soit une pénétration cellulaire très lente de l'hormone laquelle, on le sait, circule liée à certaines protéines sériques, soit une transformation préalable de la molécule en dérivé lui, immédiatement actif sur le métabolisme cellulaire. La première hypothèse a été écartée : T_3 en effet agit après un délai à peu près semblable (54, 221) et cependant elle diffuse dans les tissus, s'y concentre et y est métabolisée beaucoup plus rapidement que T_4 (5, 41, 56, 130, 156, 223). La seconde hypothèse devait donc être retenue, donnant un intérêt tout particulier à l'identification des métabolites des iodothyronines. Or parallèlement à cette étude, des recherches pharmacodynamiques sur divers produits de synthèse possédant en commun avec les hormones thyroïdiennes le squelette diphényléther, montraient que des modifications de celles-ci soit au niveau de leur hydroxyle phénolique, soit relatives au nombre et à la position des atomes d'iode, ou encore portant sur la chaîne latérale alanyl, pouvaient accroître, diminuer ou modifier leurs activités biologiques (19, 104, 117, 128, 180). Parmi les dérivés étudiés, l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA_3) devait retenir spécialement l'attention. A dose équimoléculaire, moins actif que T_3 sur la consommation d'oxygène (30, 33, 214, 215) il l'augmente par contre - dans certaines conditions - sans temps perdu (30, 33, 129, 212, 213, 214) et par ailleurs il semble intervenir électivement dans le métabolisme du cholestérol (48, 106, 118, 219). Par ailleurs, in vitro, il active tout comme les hormones thyroïdiennes la respiration de coupes de tissu (129, 212, 213, 215) et celle de mitochondries incubées (30). L'étude du métabolisme de TA_3 a montré sa diffusion rapide dans les tissus et sa concentration importante dans le foie (99, 173). Son élimination urinaire et fécale est comparable à celle de T_3 , de même que sa désallogénéation et sa glycuroconjugaison hépatique (99, 173, 176). On pouvait dès lors le considérer doué d'activité hormonale. Or TA_3 , nous l'avons vu, est un dérivé métabolique naturel de T_3 , hormone sécrétée par la thyroïde mais aussi formée dans les cellules par désioduration partielle de T_4 et possédant toutes les propriétés biologiques de cette dernière, mais avec une intensité très accrue. On était donc amené à considérer que la thyroïde exerce son action sur l'organisme, non seulement par la sécrétion de plusieurs hormones mais encore par l'intermédiaire de certains produits de leur métabolisme (57, 116, 214) et l'ensemble des faits rapportés attirait l'attention sur l'importance du rôle de T_3 et TA_3 , l'un et l'autre intermédiaires vraisemblables entre l'hormone principale T_4 produite par la glande, et les dérivés intracellulaires de celle-ci immédiatement actifs sur les récepteurs.

*

*

*

OBJET DU TRAVAIL

Pour les raisons sus-mentionnées, notre intérêt s'est porté sur le métabolisme de T_3 et de TA_3 dont par ailleurs plusieurs dérivés non identifiés avaient été signalés dans la bile, les urines (39, 40), le sang (156) et les tissus (43) pour le premier, dans la bile pour le second (153, 176).

Nous nous sommes demandé si les hormones thyroïdiennes qui possèdent un radical phényle donnant lieu à une glucuroconjugaison, ne subissaient pas également comme les phénols l'estérification sulfurique, et divers travaux récents (32, 186, 192) avaient attiré notre attention sur l'intérêt de ce problème. En effet, d'une part un ensemble de considérations relatives au métabolisme du soufre (32, 186, 192) permet d'envisager l'existence chez les animaux supérieurs d'esters sulfuriques non encore identifiés et jouant, en tant que tels ou après hydrolyse préalable, un rôle biologique important. On sait par exemple, que le sulfate d'oestrone conserve une certaine activité biologique (59) or classiquement les esters sulfuriques des phénols sont des produits de détoxification éliminés inchangés par l'organisme (74, 79, 224). Par ailleurs, la découverte récente de l'ester sulfurique de la tyrosine (10) comme constituant normal du fibrinogène signalait un sulfoconjugué de phénol utilisé par l'homme (197).

On sait d'autre part, que les sulfatases et en particulier les arylsulfatases qui sont très répandues dans le règne animal (192) hydrolysent in vitro certains esters sulfuriques, mais semblent inactives in vivo. On avait donc envisagé la possibilité de leur intervention dans la synthèse biologique des esters sulfuriques mais cette hypothèse a dû être écartée dès lors que le mécanisme de la sulfoconjugaison fut précisé (26, 27, 79) : on admet actuellement que le donneur de sulfate est le 3'-phospho-Adénosine-5'-phosphosulfate et qu'une sulfokinase assure le transfert du sulfate actif sur l'accepteur (26, 27, 79). Le rôle des sulfatases n'est donc pas élucidé mais leur existence suggère celle de substrats non identifiés, qui sont peut-être d'une grande importance biologique.

Il apparaissait dès lors intéressant de les rechercher et dans ceux-ci, les esters sulfuriques des hormones thyroïdiennes étaient possibles. Esters sulfuriques, qui ne joueraient pas nécessairement un rôle semblable aux glycuconjugués et aux sulfoconjugués des phénols toxiques mais pourraient constituer, soit une forme de transport de l'hormone, elle-même libérée ensuite dans la cellule par l'action d'une arylsulfatase, soit un dérivé hormonal directement actif, soit encore un composé, en tant que tel inactif, mais précurseur d'hormone mis en circulation dans l'organisme.

Nous nous sommes donc proposé de rechercher l'existence éventuelle d'un tel processus dans le métabolisme de T_3 et dans celui de TA_3 après avoir préparé, comme corps de référence, les esters sulfuriques de ces deux molécules. Dans la première partie de notre travail, nous avons décrit la préparation et la caractérisation de l'ester sulfurique de T_3 (ST_3) ; nous y rapportons ensuite l'identification de ST_3

dans les métabolites biliaires et sanguins du Rat traité par T_3 .

La seconde partie concerne la préparation et la caractérisation de l'ester sulfurique de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (STA_3) et son identification dans la bile, le sang et les urines du Rat traité par TA_3 .

La dernière partie de notre mémoire est consacrée à l'étude de certains aspects du métabolisme de ST_3 , les résultats de celle-ci nous ont permis de préciser le rôle biologique de ce conjugué et d'intégrer cette nouvelle voie métabolique dans l'ensemble de la biochimie des hormones thyroïdiennes.

AVANT-PROPOS ET ABREVIATIONS

Nos études chromatographiques et électrophorétiques ont été toutes effectuées sur papier et ces dernières toujours en chambre close avec papier suspendu en forme de tente : nous nous permettrons donc de ne pas le répéter à l'occasion de l'exposé de chacune d'elles.

Pour désigner les iodothyronines et certains de leurs dérivés, nous avons adopté les abréviations ou symboles énumérés ci-dessous et établis d'après les bases de la nomenclature officielle (71).

acide 4-[4'-hydroxyphénoxy]-phényl- β alanine ou thyronine : T ,

3,5,3',5'-tétraiodo-L-thyronine : T_4 ,

3,5,3'-triiodo-L-thyronine : T_3 ,

3,3',5'-triiodo-L-thyronine : T_3' ,

3,3'-diiodo-L-thyronine : T_2 ,

3,5-diiodo-L-thyronine : 3,5- T_2 ,

acides 3,5,3',5'-tétraiodo-et 3,5,3'-triiodothyropyruviques: TK_4 , TK_3 ;

acides iodothyroacétiques : TA_4 , TA_3 , TA_2 ... (suivant le nombre et la position des atomes d'iode dans la molécule).

β -glycuronides de T_4 , T_3 , TA_3 ...: respectivement GT_4 , GT_3 , GTA_3 ...;

esters sulfuriques de T_3 et TA_3 : respectivement ST_3 et STA_3 .

Pour les produits marqués par un radioélément nous avons indiqué la position, le poids atomique et le symbole de celui-ci après l'abréviation de la molécule. Ainsi:

T_3 marqué par ^{131}I en 3' : $T_3(3'-^{131}I)$

TA_3 marqué par ^{131}I en 3' : $TA_3(3'-^{131}I)$

ST_3 marqué par ^{35}S sur le radical sulfurique : $ST_3(^{35}SO_3H-)$

STA_3 marqué par ^{131}I en 3' et par ^{35}S sur le radical sulfurique : $STA_3(3'-^{131}I)(^{35}SO_3H-)$.

PREMIERE PARTIE

Sulfoconjugaison de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3)

CHAPITRE I

Préparation et caractérisation de l'ester sulfurique de $T_3(ST_3)$

Le traitement des phénols par SO_4H_2 à froid donne lieu à la formation d'ester sulfurique et d'acide sulfonique en proportion variable suivant les conditions adoptées à savoir les quantités relatives des produits mis en oeuvre, la température et la durée de l'opération (136). Une réaction semblable permet de préparer l'ester sulfurique de la tyrosine (119, 136, 197) et un mode opératoire a été établi permettant dans ce cas l'obtention d'environ 80 % d'ester sulfurique contre quelque 5 % seulement d'acide sulfonique (136). Il paraissait donc possible de synthétiser par une méthode similaire l'ester sulfurique des analogues structuraux de la thyroxine et en particulier de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) et de son dérivé acétique l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA_3).

Le principe de la réaction mise en oeuvre est le suivant : le dérivé de la thyronine est attaqué à l'état sec par un large excès d'acide sulfurique concentré à une température inférieure à $0^\circ C$. La réaction est rapidement interrompue par hydratation et neutralisation à froid du milieu réagissant dont on sépare les produits organiques des sulfates, soit par voie chimique soit par chromatographie préparative sur papier.

Dans cette première partie de notre travail, nous décrirons la synthèse et l'identification de l'ester sulfurique de $T_3(ST_3)$ marqué ou non par ^{131}I . Celles de son dérivé acétique feront l'objet de la seconde partie.

1. ESTERIFICATION SULFURIQUE DE T_3

Mode opératoire

Dans un tube à essai muni d'un bouchon rodé, on verse 0,2 ml SO_4H_2 concentré très pur ($D = 1,84$). On refroidit à $-15^\circ C$ dans un bain d'acétone-neige carbonique et on ajoute ensuite par petites portions, 32,5 mg de 3,5,3'-triiodo-L-thyronine(T_3) au préalable rigoureusement desséchée sur P_2O_5 . Entre chaque addition, le tube à essai est soustrait au mélange refroidissant jusqu'à l'obtention d'une température légèrement inférieure à celle de la congélation du milieu ce qui permet, par agita-

tion énergétique, une mise en suspension fine et homogène de T_3 dans l'acide. Celle-ci obtenue, on congèle à nouveau le milieu réactionnel. Après la dernière addition de T_3 , la suspension est maintenue 15 minutes à -15°C . On laisse ensuite sa température s'élever progressivement jusqu'à 1°C (ce qui exige une dizaine de minutes) et on la maintient 5 minutes à cette température. Elle est alors diluée par addition de H_2O , mais afin de prévenir toute désioduration par un échauffement excessif du milieu, l'hydratation est pratiquée en phase solide. Dans ce but, le tube à essai est plongé à nouveau dans le mélange acétone-neige carbonique et on y verse progressivement sous agitation continue 2,5 g de glace finement pulvérisée. L'homogénéisation réalisée, le tube est abandonné à la température ambiante. Lorsque celle du milieu réactionnel atteint environ -5°C : on verse goutte à goutte et toujours sous agitation 1,4 ml de NaOH 5 N avec précaution de manière à éviter un échauffement supérieur à $+1^{\circ}\text{C}$. La suspension est alors amenée à $\text{pH} = 8,5$ par NaOH N, puis abandonnée une heure à $+1^{\circ}\text{C}$. Un précipité apparaît, constitué principalement par des cristaux de SO_4Na_2 . Il est centrifugé et le liquide surnageant prélevé. Le culot est ensuite remis en suspension dans 0,5 ml d'une solution de NaOH N/10 saturée en sulfate de sodium et refroidie à $+1^{\circ}\text{C}$. Après centrifugation, on élimine le précipité et le surnageant est réuni à celui de l'opération précédente.

Séparation et analyse des produits de la réaction

La solution ainsi débarrassée d'un excès de sulfates et renfermant les produits organiques de la réaction est diluée au cinquième, ramenée au pH initial et analysée par chromatographie. On prépare deux chromatogrammes semblables en déposant 20 μl de la solution diluée (S) et comme témoin 30 μg de 3,5,3'-triiodo-L-thyronine.

Un troisième chromatogramme est réalisé avec 20 μl de la solution (S) préalablement portée au dixième (solution S') et dont on a vérifié l'alcalinité du pH . Les trois chromatogrammes sont développés en phase descendante avec du n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (BuOH sat. NH_4OH 2 N) comme solvant (45). Le premier (A) est révélé à la ninhydrine le second (B) au sulfate cérique-arséniate de sodium acide (réaction de Bowden et MacLagan) (14) et le troisième avec du réactif de Pauly (12).

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 1. On y note l'existence dans les produits de la réaction de deux corps (a et b). Le composé a est isolé par chromatographie préparative descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. La bande au $R_f = 0,25$ est découpée et éluee par NH_4OH à 1 %.

Une partie aliquote de l'éluat est évaporée sous pression réduite d'azote et à une température inférieure à 40°C . Le résidu sec obtenu est traité par HCl N trois minutes au bain-marie à l'ébullition. L'opération terminée, on porte à siccité comme précédemment et le produit de l'opération repris par NH_4OH concentré, est analysé chromatographiquement en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N avec comme témoins en parallèle, 30 μg de T_3 et 2,5 μg SO_4Na_2 . T_3 de référence est révélé

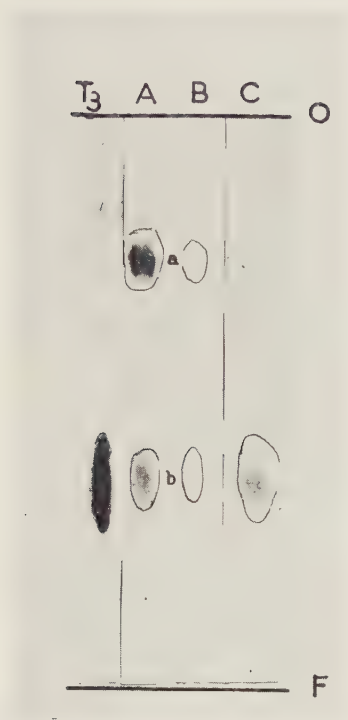


FIGURE 1.

Chromatogrammes des produits de la réaction après dilution au cinquième (A et C) ou au cinquantième (B).

A. Révélation à la ninhydrine.

B. Révélation au sulfate cérique (Bowden et Mac Lagan).

C. Révélation par le réactif de Pauly.

(a) et (b) : corps apparus après révélation des chromatogrammes A et B. Papier Whatman n° 1; solvant, n-butanol saturé par NH_4OH 2 N; O = origine, F = front, T_3 = 3,5,3'-triiodo-L-thyronine témoin.

avec le réactif de Pauly ainsi que le chromatogramme des produits de l'hydrolyse acide à l'exception de son origine laquelle de même que SO_4Na_2 témoin sont révélés par le réactif au rhodizonate (20, 21, 190). Ce dernier dans les conditions où nous l'avons utilisé, donnait une réaction nettement positive déjà avec $1 \mu\text{g}$ de Na_2SO_4 .

Discussion

La révélation des chromatogrammes montre l'existence de deux corps (a) et (b) dans les produits de la réaction. Le second (b) de faible intensité est constitué par T_3 qui n'a pas réagi. En effet il en a le même $R_f = 0,65$ et il fournit la réaction des acides aminés avec la ninhydrine (A), celle de l'iode au sulfate cérique (B) et celle des phénols au réactif de Pauly (C). Le premier (a), plus abondant, de $R_f = 0,25$ possède une fonction aminée libre (A) et est iodé (B) mais ne contient pas de groupe hydroxylphénolique libre (C). On peut donc envisager qu'il s'agisse d'un ester sulfurique soit de T_3 soit d'une thyronine moins iodée résultant d'une déshalogénation de la première. Or, sur le chromatogramme (B) aucune réaction positive au sulfate cérique n'est observée au R_f des iodures : aucune désioduration n'est donc intervenue au cours de la réaction. Par conséquent, cet ester sulfurique doit être celui de T_3 . Il en est bien ainsi car, après traitement par HCl N trois minutes au bain-marie à l'ébullition, le composé (a) régénère en totalité l'hormone triiodée et SO_4 qui est mis en évidence à l'origine du chromatogramme par le réactif au rhodizonate de sodium. Tel n'aurait pas été le cas s'il s'était agi d'un acide sulfonique non affecté par l'hydrolyse acide ménagée (136).

Résumé

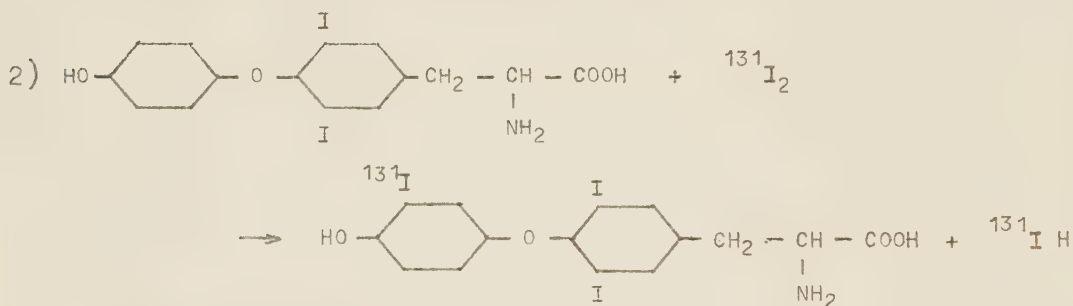
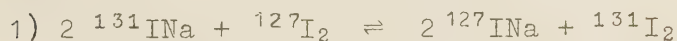
Par une méthode voisine de celle utilisée pour la préparation de l'ester sulfurique de la tyrosine (119, 136, 197), nous avons préparé l'ester sulfurique de T_3 par action directe à froid de SO_4H_2 concentré sur l'hormone thyroïdienne triiodée, synthèse qui n'avait pas encore été décrite.

Cette réaction menée dans des conditions évitant toute désioduration de l'iodothyronine, donne naissance à un produit chromatographiquement distinct de T_3 en n-butanol saturé par $\text{NH}_4\text{OH 2 N}$ (R_f respectifs 0,25 et 0,65). Il a été identifié à l'ester sulfurique de T_3 grâce aux observations suivantes : il fournit la réaction des acides aminés mais non celle des phénols (Pauly) par ailleurs, son hydrolyse acide fait réapparaître une réaction de Pauly positive et l'analyse chromatographique des produits de celle-ci permet d'identifier T_3 et SO_4 alors que tel ne serait pas le cas s'il s'agissait d'un dérivé sulfonique.

Par analogie avec les symboles choisis pour les autres métabolites des iodothyronines, nous proposons l'abréviation ST_3 pour désigner l'ester sulfurique de T_3 .

2. PREPARATION DE $T_3(3'-^{131}I)$

La préparation de $T_3(3'-^{131}I)$ destiné à la synthèse de l'ester sulfurique de l'hormone triiodée marquée ainsi qu'aux recherches biologiques que nous exposerons dans les chapitres suivants, a été conduite suivant un mode opératoire antérieurement décrit (166) par ioduration de la 3,5-diiodo-L-thyronine ($3,5-T_2$) en milieu ammoniacal. Des modifications de détail ont été apportées à la technique précédente dont le principe repose d'une part, sur une réaction d'échange (1) en milieu acide entre ^{131}INa sans entraîneur donc en quantité infinitésimale et $^{127}I_2$ en quantité pondérale et, d'autre part, sur la substitution préférentielle des hydrogènes en position ortho (2) par rapport à l'hydroxyle phénolique de la thyronine. Ces réactions peuvent s'écrire comme suit :



Mode opératoire

a) Préparation du matériel. Trois micropipettes en verre effilé jaugées à 10,50 et 50 μl sont fabriquées ainsi que deux agitateurs. L'aspiration dans ces pipettes est obtenue au moyen d'une micropompe. Deux tubes en verre pyrex de petite dimension sont également nécessaires (8 mm de diamètre et 25 mm de haut). Les manipulations des produits radioactifs s'effectuent sous hotte en prenant toutes les mesures de radioprotection indispensables.

b) Préparation des solutions. Quelques heures à l'avance, on prélève la quantité voulue de la solution mère de ^{131}INa sans entraîneur en provenance du Centre d'Amersham (Angleterre) qui renferme habituellement 50 mC en solution dans 1 ml d' H_2O légèrement sodique ($\text{pH} = 8,5$) et exempte de tout réducteur. La prise d'essai est déposée dans un des deux petits tubes (tube 1) préalablement taré et ensuite placé sous P_2O_5 et concentré sous pression réduite jusqu'à obtention d'un résidu sec dont le poids est évalué. Ce résidu est essentiellement constitué par du carbonate de Na (0,1 à 0,5 mg) pour 200 ou 300 mg de solution mère. On dispose de solutions de SO_4H_2 , 1, 2 et 3 N et au moment de la synthèse, on prépare une solution alcoolique de $^{127}I_2$ (32,5 mg dans 25 ml d'éthanol absolu) ainsi qu'une solution ammoniacale de 3,5- T_2 (Glaxo Laboratories Greenford, Middlesex) renfermant 1,5 mg dans 1 ml de NH_4OH concentré ($D = 0,92$).

c) Ioduration de 3,5-T₂. Le résidu contenant ¹³¹INa est repris par 10 µl SO₄H₂ (1, 2 ou 3 N suivant la quantité de Na₂CO₃ présente) de manière à obtenir une solution acide de pH = 4-5 favorable à la réaction d'échange avec ¹²⁷I₂.

A cette solution acide de ¹³¹INa on ajoute 50 µl de la solution alcoolique de ¹²⁷I₂ (soit 65 µg d'iode) et on mélange soigneusement au moyen du micro-agitateur. Dans le second microtube (tube 2) on verse 50 µl de la solution ammoniacale de 3,5-T₂ (100 µg) et le tube muni d'un support est placé dans un cristallisateur et entouré de glace pilée. La micropipette ayant servi à prélever la solution d'iode est utilisée pour déverser goutte à goutte la solution d'iode radioactif dans le tube 2 contenant la diiodothyronine. Cette opération est effectuée lentement et sous agitation de manière à éviter qu'un apport d'iode en excès ne favorise la formation de tétraiodothyronine. L'ioduration de la thyronine se manifeste par une décoloration régulière de la solution iodée. L'opération terminée le contenu du tube 2 de synthèse est en totalité transvasé dans le tube 1. Ils sont alors tous deux placés dans la glace et abandonnés pendant une heure.

d) Séparation des produits de la réaction. La séparation des produits de synthèse s'effectue en deux étapes; la première élimine les iodures radioactifs et la seconde sépare les iodothyronines marquées. Dans ce but le contenu des tubes 1 et 2 est déposé le long d'une ligne de 15 cm sur papier Whatman n° 1 destiné à une électrophorèse préparative. Les tubes sont lavés soigneusement à trois reprises par 50 à 100 µl de NH₄OH concentré et la solution de lavage est elle-même déposée sur le papier.

L'électrophorèse est effectuée dans les conditions suivantes réalisant une bonne séparation entre les iodures qui migrent de 5 à 10 cm vers l'anode et les iodothyronines qui demeurent à l'origine : tampon CO₃(NH₄)₂ 0,2 M de pH = 9, 2 heures sous 200 Volts et 18-20 mA pour un papier de 20 cm de large sur 40 de long déposé en forme de tente. Le papier d'ionophorèse est séché sous hotte et placé trois minutes au contact d'un film radiographique (Kodak-Kodirex sans écran) qu'on révèle (Fig. 2). Cette autoradiographie permet de découper exactement la bande de l'ionophorègramme renfermant les radioiodothyronines (Fig. 2, 1, I). Celles-ci sont éluées pendant 24 heures par du n-butanol saturé par H₂O (dans ces conditions on élue 70 à 80 % des corps marqués). Les produits de cette opération sont alors soumis à une chromatographie en phase descendante en n-butanol saturé par NH₄OH 2 N. Un autoradiochromatogramme est réalisé par mise en contact du chromatogramme avec un film radiographique pendant dix minutes (Fig. 2, 2). Il montre trois bandes principales : l'une au R_f des iodures, l'autre au R_f de la thyroxine et la troisième - la plus importante - correspondant à T₃(3'-¹³¹I). Cette dernière est découpée et élue durant 24 heures par du n-butanol saturé d'eau.

e) Préparation de la solution de T₃(3'-¹³¹I). L'éluat butanolique renfermant T₃(3'-¹³¹I) est concentré jusqu'à siccité sous azote et pression réduite, à une température inférieure à 40°C. Le résidu est

repris par une goutte de NaOH N puis porté à un volume voisin de celui désiré par addition d'eau et le pH est ajusté à 9-10 par HCl N puis 0,1 N. Le volume de cette solution est mesuré et la pureté du produit est vérifiée par une autoradiochromatographie sur une prise d'essai fournissant environ 10.000 impulsions/minute (Fig. 2,3) au Geiger.

f) Rendement et activité spécifique. Le rendement a été calculé en pour-cent du rendement théorique. Celui-ci est de 100 % si dans une réaction d'ioduration mettant en oeuvre deux atomes d'iode par molécule de 3,5-T₂, on obtient une quantité de T₃ correspondant à l'utilisation d'un atome d'iode. Comme la radioactivité spécifique de l'iode utilisé est connue, la mesure de la radioactivité de ¹³¹I Na au départ et celle de T₃(3'-¹³¹I) obtenue après séparation chromatographique, permettent de calculer le rendement R de la réaction à partir de l'iode mis en oeuvre et exprimé en pour-cent du théorique :

$$R = \frac{100 \times n \times i}{I},$$

où n = le nombre d'atomes d'iode employé par molécule de 3,5-T₂ ;
i = la radioactivité de T₃(3'-¹³¹I) en μ C et
I = la radioactivité en μ C de ¹³¹I Na utilisé. L'activité spécifique S = μ C de T₃(3'-¹³¹I) par μ g, est établie de la manière suivante :

$$S = \frac{^{131}\text{I}}{^{127}\text{I}} \times 0,195$$

où ¹³¹I est la quantité d'iode radioactif utilisée et exprimée en μ C, ¹²⁷I celle de l'iode en μ g et 0,195 = le poids atomique de l'iode divisé par le poids moléculaire de T₃. Les différentes synthèses réalisées ont été conduites avec 50 à 100 μ g de 3,5-T₂ et l'ioduration a été opérée avec 2,5 - 3 atomes d'iode par molécule de 3,5-T₂, iode préalablement marqué par une réaction d'échange avec 6 à 17 mC de ¹³¹I Na. Nous avons ainsi obtenu des rendements de 20 à 35 % du théorique suivant les conditions adoptées et en particulier le volume total de dissolution (65-110 μ l). Les radioactivités spécifiques de T₃(3'-¹³¹I) étaient comprises entre 20 et 50 μ C/ μ g.

Discussion

Le rendement de cette réaction d'ioduration dépend des quantités relatives des produits mis en oeuvre et du volume total de dissolution dans lequel elle s'opère. Les conditions optimales ont été établies antérieurement (166, 207) et ce sont celles que nous avons adoptées. La radioactivité spécifique de l'hormone marquée constitue le résultat à notre point de vue le plus important puisque, suffisante, elle permet l'étude du métabolisme de la molécule après injection de quantités très faibles, c'est-à-dire physiologiques. Toutes autres conditions égales, elle est proportionnelle à la quantité d'iode radioactif utilisée. Dans la technique de microsynthèse décrite précédemment (166), la réaction s'opère sur quelques 20 μ g de 3,5-T₂ dans un volume de 20 à 25 μ l. Elle permet par conséquent avec des radioactivités égales à celles utilisées par nous, d'obtenir des activités spécifiques quatre à cinq fois supérieures, mais les manipulations sont beaucoup plus délicates, ce

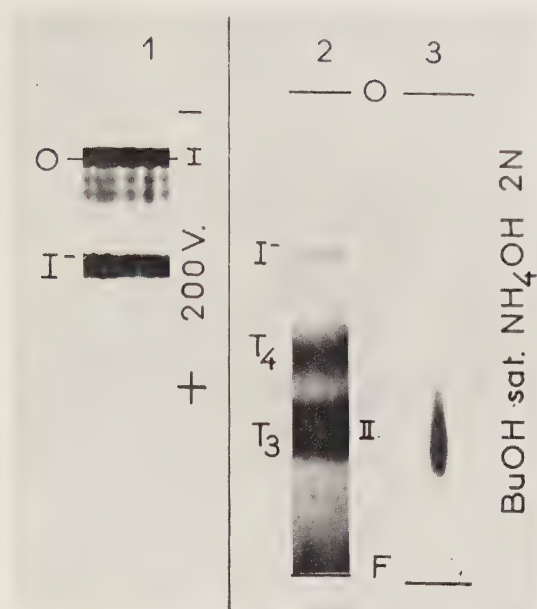


FIGURE 2.

Autoradiogrammes des produits de la réaction d'ioduration de 3,5-T₂ par ¹³¹I₂.

1. Electrophorèse préparative en CO₃ (NH₄)₂ 0,2 M, pH = 9, sous 200 V, 20 mA, pendant deux heures.
2. Chromatographie préparative descendante en n-butanol saturé par NH₄OH 2 N de l'éluat I de 1.
3. Chromatographie descendante en n-butanol saturé par NH₄OH 2 N de l'éluat II de 2.

(O = origine; F = front; T₄, T₃ et I⁻ = position des corps de référence.)

qui complique les mesures de radioprotection et les pertes de produit sont plus importantes. Nous avons donc opéré sur des quantités plus élevées et avec un volume total de dissolution plus grand, nous procurant cependant un rendement satisfaisant. Nous avons travaillé avec des quantités de radioactivité moyennes mais suffisantes pour obtenir $T_3(3' - ^{131}I)$ douée d'une activité spécifique permettant de réaliser dans de bonnes conditions les recherches envisagées.

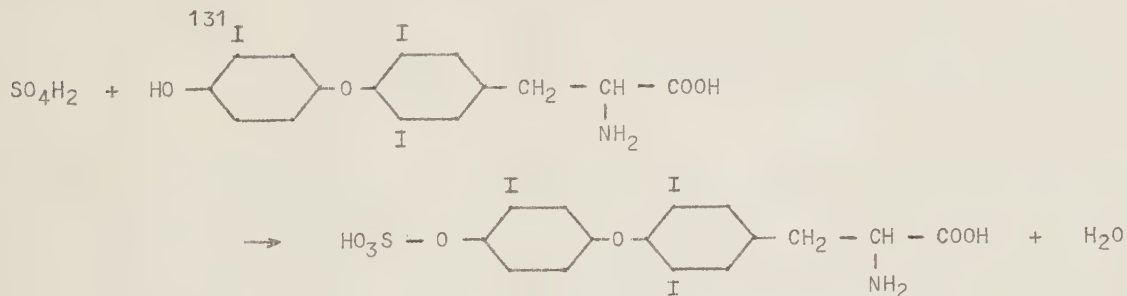
Ces activités spécifiques auraient pu être considérablement augmentées par l'emploi de radioactivités beaucoup plus élevées de ^{131}I Na.

Résumé

Nous avons préparé la $T_3(3'-^{131}I)$ par ioduration de 3,5- T_2 en milieu ammoniacal au moyen d'une solution hydro-alcoolique acide d'iode ($^{127}I_2 + ^{131}INa$), et suivant une technique semblable à celle précédemment décrite. Des modifications de détail ont été apportées pour simplifier les manipulations et faciliter la radioprotection en opérant sur 50-100 μg de 3,5- T_2 . Les radioactivités spécifiques obtenues étaient de 24 à 50 $\mu C/\mu g$.

3. ESTERIFICATION SULFURIQUE DE $T_3(3^{-131}I)$

Cette réaction a été effectuée par action directe à froid de SO_4H_2 concentré sur $\text{T}_3(3\text{'-}^{131}\text{I})$. Les modes opératoires de cette estérification et du marquage de l'hormone ont été précisés dans les paragraphes précédents. De manière à obtenir une activité spécifique suffisante pour le sulfoconjugué de T_3 , nous avons été amenés à modifier quelque peu la technique d'estérification dont la réaction peut s'écrire comme suit :



Ces modifications seront rapportées en décrivant à titre d'exemple une des synthèses.

Mode opératoire

Nous avons utilisé 300 μg de $\text{T}_3(3^1\text{-}^{131}\text{I})$ possédant une radioactivité de 200 μC , dissous dans 300 μl de NH_4OH concentré. On ajoute 60 mg

de poudre de verre à la solution puis on évapore sous vide et sous agitation jusqu'à siccité absolue. La poudre de verre sert de support à T_3 qui s'y adsorbe et permet de la verser lentement (20 minutes) par petites portions, dans 100 μ l de SO_4H_2 pur ($D = 1,84$) congelé dans un bain-marie acétone-neige carbonique. Le mélange est réalisé sous agitation en laissant la température, après chaque addition de poudre de verre, monter progressivement au delà du point de congélation de l'acide. L'opération terminée, la suspension est abandonnée à $+1^\circ C$ pendant cinq minutes, puis amenée à $pH = 10$ par adjonction progressive de 0,6 ml de NH_4OH concentré. Pendant la neutralisation, le tube renfermant le milieu réactionnel est placé dans le mélange réfrigérant.

Séparation des produits de la réaction

La poudre de verre éliminée par centrifugation, les produits de la réaction sont déposés sur papier Whatman n° 1 le long d'une ligne de 35 cm et soumis à une chromatographie descendante en BuOH saturé par NH_4OH 2 N. Celle-ci sépare T_3 , ST_3 et I^- de la masse de $SO_4(NH_4)_2$ qui demeure à l'origine. Une autoradiographie (Fig. 3,A) permet de repérer la zone $R_f = 0,20$ correspondant à $ST_3(3'-^{131}I)$ qu'on élue par NH_4OH à 1 %. (Avec ce solvant, plus de 80 % sont élués en deux heures dans un volume de 1 à 2 ml alors que le butanol saturé d'eau, en 24 heures, élue seulement le quart dans un volume double.) Cet éluat est soumis à une nouvelle chromatographie préparative dans le même solvant (Fig. 3,B). On élue à nouveau et de même la zone correspondant à $ST_3(3'-^{131}I)$. Enfin on élimine complètement les iodures par une électrophorèse préparative (papier Whatman n° 1 de 20 x 40 cm) en $CO_3(NH_4)_2$ 0,05 M, $pH = 9$, sous 500 Volts, 25 mA pendant cinq heures : les iodures migrent vers l'anode à plus de 15 cm de l'origine alors que $ST_3(3'-^{131}I)$ est à 7-8 cm de celle-ci comme le montre la Fig. 3,C,3. Il est élué par NH_4OH à 1 % : éluat 3.

Identification et caractérisation de $ST_3(3'-^{131}I)$

Une partie aliquote de l'éluat 3 est utilisée pour identifier le produit. Par hydrolyse acide ménagée (HCl N, au bain-marie à l'ébullition pendant dix minutes) $T_3(3'-^{131}I)$ est régénéré comme le montre l'autoradiochromatogramme de la Fig. 3,D,a et b. Il en est de même après action de la Taka-diaxase dans les conditions suivantes : 0,3 μ g environ du produit marqué de l'éluat 3, dans 100 μ l d'eau à $pH = 6,5$ tamponnée par l'acétate de sodium et additionnée de 1,6 mg de Taka-diaxase, cette solution étant incubée six heures à $37^\circ C$ (Fig. 3,D,c et d). Ces résultats permettent d'affirmer la présence de $ST_3(3'-^{131}I)$ dans l'éluat 3. Sa pureté a par ailleurs été vérifiée par chromatoelectrophorèse : chromatographie descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N pour la première dimension, et électrophorèse en $CO_3(NH_4)_2$ 0,05 M, de $pH = 9$, sous 500 Volts, 25 mA pendant cinq heures, pour la seconde dimension perpendiculaire à la première. L'autoradiochromatoelectrophorègramme met en évidence une tache unique (voir chapitre II, figure 5),

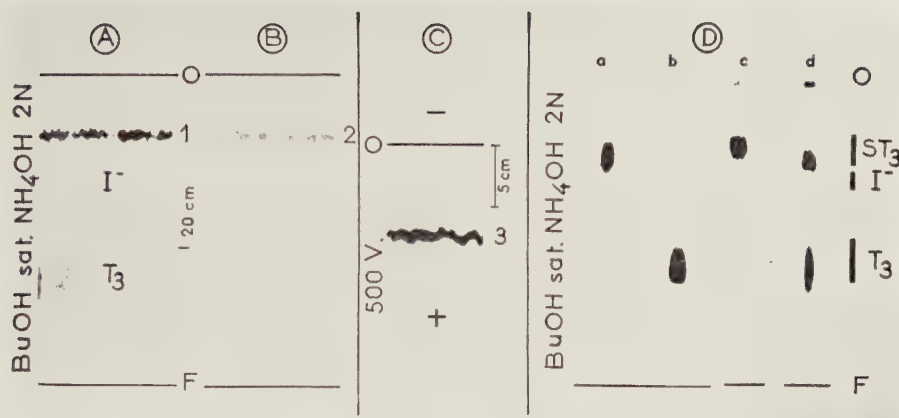


FIGURE 3.

- A. Autoradiochromatogramme des produits de la réaction de SO_4H_2 sur T_3 ($3'\text{-}^{131}\text{I}$), analysés en $n\text{BuOH}$ saturé par NH_4OH 2 N (phase descendante).
 - B. Autoradiochromatogramme du produit de l'éluat de la bande 1 de A, analysé en BuOH saturé par NH_4OH 2 N.
 - C. Autoradioionophorègramme de l'éluat de la bande 2 de B, soumis à une électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, pH = 9, sous 500 V, 30 mA pendant cinq heures.
 - D. Autoradiogrammes du produit de l'éluat 3 de C, soumis à une chromatographie en BuOH saturé par NH_4OH 2 N, avant et après hydrolyse, soit par ClH (a et b), soit par la Taka-diastrase (c et d).
- a : éluat 3;
b : produit de l'éluat 3 après hydrolyse acide ménagée (ClH N, 10 min. au bain-marie bouillant);
c : éluat 3 incubé à pH = 6,5, pendant six heures à 37°C ;
d : éluat 3 incubé en présence de Taka-diastrase à pH = 6,5 pendant six heures à 37°C .
- (ST_3 , T_3 et I^- : position des corps de référence.)

les traces d'iodure présentes dans l'éluat (moins de 1 %), ne sont pas visibles sur le document : dans ces conditions d'électrophorèse, ils migrent en effet vers l'anode à plus de 15 cm de l'origine. Cette préparation de $ST_3(3'-^{131}I)$ nous a permis de caractériser ce corps comparativement à $T_3(3'-^{131}I)$ et à $^{131}I^-$, dans des conditions voisines de celles que nous devons rencontrer dans nos recherches biologiques, c'est-à-dire en travaillant sur des quantités de produit de l'ordre du μg . Nous avons précisé les propriétés chromatographiques de ST_3 dans huit solvants et son comportement ionophorétique en tampon $CO_3(NH_4)_2$ 0,2 et 0,05 M, de $pH = 9$, respectivement sous 200 Volts pendant deux heures, et 500 Volts durant cinq heures. Les résultats de cette étude sont rassemblés dans le tableau 2. On y remarque que les solvants chromatographiques n° 1, 2, 3 et 6, ainsi que l'électrophorèse sous haut voltage sont particulièrement intéressants pour séparer le sulfoconjugué de l'hormone triiodée et des iodures. Il est à noter que le sulfoconjugué par rapport à l'hormone dont il dérive possède un coefficient de partage extrêmement différent dans les solvants butanoliques employés. En électrophorèse à $pH = 9$ sous 500 Volts, il se déplace notablement vers le pôle positif alors que l'hormone se détache à peine de l'origine. La migration électrophorétique de l'une et l'autre de ces molécules dépend des pK de leurs groupes polaires $-COOH$, $-NH_2 - OH$ pour T_3 , et $-COOH$, $-NH_2$ et $-OSO_3H$ pour ST_3 . Puisque ST_3 se déplace plus rapidement dans le champ électrique que T_3 , on peut donc admettre que le groupe sulfurique de ST_3 a un pK inférieur à celui de l'hydroxyle phénolique de T_3 .

*

*

*

Tableau I

R_f à 18°C

SOLVANTS (207)	PRODUITS ANALYSES	R _f à 18°C		
		ST ₃	T ₃	I ⁻
1. n-butanol saturé par NH ₄ OH 2 N : phase descendante (45)		0,20	0,65	0,30
2. n-butanol-acide acétique-H ₂ O (78:5:17) phase descendante (145)		0,09	0,70	0,20
3. méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1:2:5) pH = 6,1 phase ascendante (165)		0,50	0,25	0,63
4. Collidine-H ₂ O (100:35) atm. NH ₃ phase ascendante (201)		0,63	0,70	0,80
5. pentanol tertiaire sat. par NH ₄ OH 2 N phase circulaire (166)		0,26	0,40	0,18
6. n-butanol-éthanol-H ₂ O (100:20:40) phase ascendante (209)		0,38	0,77	0,25
7. propanol-NH ₄ OH 0,15 N (100:50) phase ascendante (209)		0,76	0,90	0,66
8. n-butanol-éthanol-NH ₄ OH 2 N (100:20:40) phase ascendante (209)		0,40	0,63	0,40
Electrophorèse		Migration en cm vers l'anode		
		ST ₃	T ₃	I ⁻
Tampon CO ₃ (NH ₄) ₂ 0,2 M pH = 9 , 200 Volts, 18 mA, deux heures (166)		1 - 2	0	7 - 10
Tampon CO ₃ (NH ₄) ₂ 0,05 M , pH = 9 , 500 Volts, 25 mA, cinq heures (173)		5 - 8	1 - 2	15

Rendement et Activité spécifique

Les radioactivités spécifiques obtenues ont nécessairement été assez faibles en raison de la quantité importante de T₃ entraîneur nécessaire pour un rendement satisfaisant de la réaction. Ce rendement a été de 25 à 60 % calculé à partir de T₃ et nous avons préparé ST₃(3'-¹³¹I) avec des radioactivités de 0,6-1 µC/µg.

Résumé

Nous avons préparé l'ester sulfurique de $T_3(3'-^{131}I)$ par action directe à froid de SO_4H_2 concentré sur l'hormone marquée. $ST_3(3'-^{131}I)$ a été caractérisé dans huit solvants chromatographiques et son comportement électrophorétique a été précisé. Comparativement à l'hormone triiodée dont il dérive (et qu'il régénère après hydrolyse acide ménagée ou par action de la Taka-diaстase), il migre moins loin dans les solvants butanoliques et en électrophorèse à $pH = 9$ sous 500 Volts il se déplace vers le pôle positif alors que la triiodo-thyronine reste au voisinage du départ. $ST_3(3'-^{131}I)$ a été utilisé comme corps de référence dans les recherches biologiques exposées dans cette partie de notre travail et nous a permis d'étudier certains aspects de son métabolisme chez l'animal, recherches exposées dans la troisième partie de ce mémoire.

CONCLUSIONS

Nous avons mis au point une méthode de microsynthèse de l'ester sulfurique de T_3 (ST_3) produit qui n'avait pas encore été préparé. Le principe de la réaction mise en oeuvre avait été décrit antérieurement pour la préparation de l'ester sulfurique de la tyrosine (136) : l'acide aminé à l'état sec, est attaqué à froid par SO_4H_2 concentré qui est ensuite neutralisé.

Nous avons, par chromatographie, séparé ST_3 des produits de la réaction et nous l'avons caractérisé en montrant que l'hydroxyle phénolique était bloqué mais non le groupement aminé, et par ailleurs, qu'après hydrolyse acide ménagée, la molécule régénérerait T_3 et $SO_4^{=}$. Au moyen de cette technique mais à partir cette fois de $T_3(3'-^{131}I)$ nous avons préparé $ST_3(3'-^{131}I)$. Le produit a été purifié par chromatographie et électrophorèse préparatives successives. Ses propriétés chromatographiques dans plusieurs solvants, et ses caractéristiques électrophorétiques ont été étudiées comparativement à celles de T_3 . Nous avons donc préparé le corps de référence nécessaire pour nos recherches biologiques, et ayant précisé certaines de ses propriétés il nous était dès lors possible d'élaborer une méthode analytique pour son identification en tant que métabolite éventuel de T_3 dans les humeurs.

*

*

*

CHAPITRE II

Identification de ST_3 dans la bile du Rat thyroïdectomisé traité par T_3

Après administration de $T_3(3'-^{131}I)$ à dose physiologique au Rat thyroïdectomisé, l'analyse chromatographique de la bile en collidine aqueuse en atmosphère NH_3 , met en évidence plusieurs métabolites marqués de l'hormone injectée : son dérivé pyruvique TK_3 , son produit de conjugaison avec l'acide glycuronique GT_3 et une large zone radioactive de R_f compris entre 0,50 et 0,70, qui paraît correspondre à plusieurs produits (153, 156). L'éluat de celle-ci rechromatographié dans d'autres solvants, révèle effectivement l'existence de deux corps marqués principaux : l'un d'eux est l'hormone injectée T_3 , l'autre, un dérivé inconnu. Ce dernier, dans des conditions expérimentales comparables avec des animaux préalablement injectés de $^{35}SO_4Na_2$, fournit en chromatographie en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N, une tache radioactive assez étalée renfermant ^{35}S ainsi que ^{131}I et de R_f légèrement inférieur à celui des iodures (181). Or, dans le foie et la bile du Lapin traité par $T_3(3'-^{131}I)$ on a signalé également un métabolite iodé "X" marqué qui s'est avéré être un "complexe" de T_3 puisqu'il régénère celle-ci après traitement par HCl à chaud (57). Dans des conditions expérimentales semblables il semble bien que ce soit ce même "complexe" de T_3 qui ait été observé dans la bile et l'intestin grêle du cobaye (43). En effet, il occupe en chromatographie en n-butanol-dioxane saturé par NH_4OH 2 N une position voisine de celle des iodures, et on sait que ce solvant sépare les diverses iodothyronines, leurs métabolites connus et les iodures de manière analogue au n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.

Ces diverses études analytiques semblaient donc conduire à une même conclusion à savoir qu'il apparaît dans la bile un métabolite iodé de T_3 , "complexe" de l'hormone (43, 57) possédant des propriétés chromatographiques dans deux solvants du moins très voisines de celles établies par nous pour l'ester sulfurique de T_3 obtenu par synthèse. La sulfoconjugaison biologique de cette hormone paraissait donc très probable (153, 181). L'objet de notre travail a été d'en faire la démonstration. Dans ce but nous avons cherché à isoler à l'état pur ce métabolite inconnu de T_3 . Nous avons ensuite étudié ses propriétés chromatographiques dans plusieurs solvants et sa migration électrophorétique comparativement avec celles de ST_3 . Par ailleurs, nous nous sommes proposé de réaliser des conditions expérimentales permettant d'espérer l'obtention d'un sulfoconjugué biologique de T_3 marqué simultanément par ^{131}I et ^{35}S , double marquage rendant possible d'identification des deux fragments de la molécule après son hydrolyse. Enfin, il importait de vérifier la formation de ce dérivé dans des conditions strictement physiologiques, c'est-à-dire après administration d'une dose très faible d'hormone, voisine de celle normalement déversée dans le sang par la glande.

Mode opératoire

Synthèse des produits marqués

La synthèse de $T_3(3'-^{131}I)$ et celle de $ST_3(3'-^{131}I)$, son ester sulfurique marqué (corps de référence) ont été réalisées comme décrit au chapitre précédent. Deux préparations de $T_3(3'-^{131}I)$ ont été utilisées, d'une radioactivité spécifique de 25 et 50 $\mu C/\mu g$ dissous dans 0,5 ml d'eau à pH = 9 par adjonction de NaOH. Celle de $ST_3(3'-^{131}I)$ était de 0,67 $\mu C/\mu g$ en solution dans 1 ml d'eau à pH = 9.

Mesures de radioactivité et autoradiographies

La radioactivité de ^{131}I sur échantillon liquide a été déterminée avec un compteur à scintillations à cristal creux de INa activé au Tl (Tracerlab). Celles de ^{131}I et de ^{35}S sur échantillon sec ou sur papier ont été mesurées avec un compteur de Geiger Müller à fenêtre de mica de 2 mg/cm^2 . Les prélèvements ont été effectués de manière à pouvoir négliger l'auto-absorption du rayonnement par leur résidu sec. En ce qui concerne les documents sur papier, on n'a pas tenu compte de l'absorption du rayonnement β par le support car elle est pratiquement constante et de l'ordre de 45 % pour ^{35}S avec le Wathman n° 1 et 55 % avec le Wathman n° 3MM. Les radioactivités respectives de ^{131}I et de ^{35}S dans des produits contenant les deux radioéléments ont été évaluées à partir de deux mesures au compteur de Geiger Müller, la fenêtre couverte ou non d'un filtre d'aluminium de 20 mg/cm^2 absorbant 50 % de la radioactivité de l'iode et la totalité des β de ^{35}S . En effet ces deux radioéléments sont émetteurs de rayonnements de type et de qualité très différents : ^{35}S est un radiateur β^- de 0,107 MeV alors que ^{131}I émet des β^- de 0,6 MeV et des γ de 0,37 - 0,08 MeV.

Les autoradiographies des chromatogrammes et des ionophorègrammes ont été établies par leur mise au contact de films radiologiques Kodak Kodirex (sans écran et émulsionnés sur les deux faces) pendant une durée fonction de la radioactivité totale du produit analysé et du nombre possible des constituants, sachant qu'une irradiation totale correspondant à 10^6 impulsions au compteur Geiger-Müller par 1 cm^2 fournit un noircissement suffisant à la révélation du film. De manière à pouvoir distinguer dans les produits complexes analysés, les composés renfermant ^{131}I , avec ou sans ^{35}S , de ceux marqués uniquement par ce dernier radioélément, on a interposé entre le chromatogramme et le film une bande étroite d'aluminium (20 mg/cm^2) couvrant en partie seulement les taches radioactives et retenant en totalité les β de ^{35}S éventuellement présents dans celles-ci. Dans ces conditions, les produits marqués par ^{131}I impressionnent le film dans la zone couverte par l'écran alors que tel n'est pas le cas pour ceux contenant uniquement ^{35}S .

Les radiochromatogrammes ont été établis par mesure de la radioactivité centimètre par centimètre (fenêtre de 1 x 3 cm) avec un compteur

de G.M. Une double mesure avec et sans écran (voir plus haut) a permis pour les documents relatifs à des produits marqués par ^{131}I et ^{35}S d'établir les tracés revenant à l'un et l'autre des deux radioéléments.

Expériences biologiques et analyses des produits biliaires

On a utilisé des Rats σ d'environ 150 g, thyroïdectomisés depuis trois semaines et maintenus à 24°C. Une dérivation biliaire à la peau est réalisée par mise en place d'un fin tube de polythène à demeure dans le canal cholédoque. L'opération terminée, les animaux sont fixés à un support permettant la récolte de la bile. Pendant la durée de l'expérience ils sont maintenus en état de préanarcose par injections répétées de penthio-barbital sodique (1 mg/100 g de poids corporel, toutes les six heures, par voie musculaire) et sont hydratés par administration sous-cutanée de sérum physiologique. Les animaux ont été répartis en quatre groupes (I, II, III et IV) et la totalité de la bile a été recueillie au cours des 18 premières heures suivant l'injection des produits marqués.

Groupe I. Les trois rats du premier groupe reçoivent par voie intramusculaire 450 μC de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ à doses traceuses (Amersham, Angleterre) mais pas d'hormone marquée. Semblable injection se résorbe rapidement et le radiosulfate se mélange avec SO_4Na_2 de l'organisme intervenant alors comme entraîneur. Il en résulte que la radioactivité spécifique des sulfates chez ces animaux est très faible et qu'il en est à fortiori de même pour tous les produits organiques soufrés susceptibles d'intervenir comme donneurs de sulfate dans la sulfoconjugaison. Par ailleurs chez ces Rats hypothyroïdiens par ablation préalable de la thyroïde, le taux d'iodothyronines circulantes est très bas. Dans ces conditions et en admettant que les hormones thyroïdiennes subissent une sulfoconjugaison, on était en droit de considérer que les produits de l'excrétion biliaire ne pouvaient pas renfermer des quantités mesurables de sulfoconjugué de T_3 marqué par ^{35}S . Par contre ils pouvaient contenir d'autres corps organiques marqués possédant dans certains solvants des R_f voisins de ceux de ST_3 et compliquant dès lors les recherches ultérieures envisagées. Il importait d'abord de préciser comment on pouvait les séparer de celui-ci.

Les produits organiques marqués par ^{35}S dans la bile de ces rats, ont été analysés et comparés à ST_3 de référence par chromatographie dans divers solvants après une électrophorèse préparative. La bile obtenue (9 ml renfermant moins de 5 % de la radioactivité injectée) est déposée sur papier Whatman n° 3MM (30 x 40 cm) le long d'une ligne de 20 cm à raison d'environ 100 μl /1 cm et est soumise à une électrophorèse en tampon $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, de pH = 9, sous 500 Volts, 40 mA pendant cinq heures. On sépare de la sorte les sels minéraux, en particulier $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ (plus des 3/4 de la radioactivité totale) des produits organiques marqués qui migrent vers l'anode avec une partie des pigments dans une zone de 5 à 10 cm de l'origine (Fig. 4,A,1). Ils sont élués pendant 24 heures par du n-butanol saturé d' H_2O . Le produit de cette élution (éluat 1) qui n'entraîne que partiellement les pigments, est

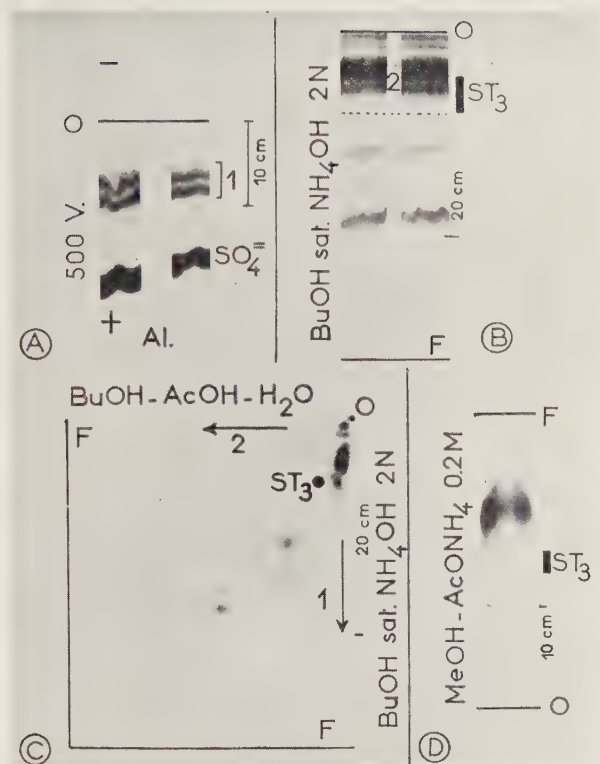


FIGURE 4.

Autoradiographies de documents obtenus avec la bile de Rats injectés de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$.

A. Electrophorèse préparative en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, sous 500 V, pendant 5 heures.

B. Chromatographie descendante de l'éluat 1, en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.

C. Chromatographie bidimensionnelle de l'éluat 1 : n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (première dimension) et n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17) (seconde dimension).

D. Chromatographie ascendante de l'éluat 2 en méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1 : 2,5) pH = 6,1.

O = origine; F = front; ST_3 = position de l'ester sulfurique de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine de référence. Al = écran d'aluminium interposé entre le film et le document.

analysé par chromatographie préparative descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N et par chromatographie bidimensionnelle en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (1ère dimension) et en n-butanol-acide acétique- H_2O (78:5:17) (seconde dimension). Sur l'autoradiographie du chromatogramme monodimensionnel (Fig. 4,B) on note la présence de produits marqués au niveau de ST_3 de référence (Fig. 4,B,2) dont ils ne se séparent que partiellement en butanol acétique ainsi qu'en témoigne l'autoradiochromatogramme bidimensionnel (Fig. 4,C).

Ces composés (Fig. 4,B,2) sont élués par NH_4OH à 1 % (éluat 2) et soumis à une chromatographie ascendante en méthanol acétate d'ammonium 0,2 M (1,2,5) de $\text{pH} = 6,1$ ($\text{MeOH} - \text{AcO NH}_4$). Celle-ci met en évidence au moins deux corps distincts ($R_f = 0,60$ et $0,65$) nettement séparés de ST_3 ($R_f = 0,50$) (Fig. 4,D).

Les résultats de cette étude préliminaire ont servis de base à la technique analytique des recherches suivantes. Ils montrent en effet l'intérêt de l'électrophorèse préparative qui élimine les sels minéraux radioactifs ou non, et de l'élution subséquente par le butanol saturé d' H_2O qui abandonne sur le papier une partie des pigments. Les uns et les autres risquent en effet de perturber les chromatographies ultérieures. Ces résultats soulignent par ailleurs la nécessité, pour la recherche de ST_3 dans la bile des animaux des autres groupes, injectés simultanément de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et T_3 marquée par ^{131}I , de procéder à des purifications par chromatographies préparatives successives dans les trois solvants précités. De cette manière on évite l'isolement simultané dans la zone correspondant au R_f de ST_3 , d'un produit marqué par ^{131}I et d'un autre marqué par ^{35}S possédant tous deux des R_f voisins, ce qui porterait à conclure de manière erronée à l'existence d'un métabolite de T_3 marqué simultanément par les deux radioéléments.

Groupe II. Le second groupe d'animaux comprend six Rats auxquels on injecte par voie intra-musculaire $450 \mu\text{C}$ de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et une heure plus tard $1,2 \mu\text{g}$ de T_3 ($3' - ^{131}\text{I}$) ($25 \mu\text{C}/\mu\text{g}$). La bile récoltée (27 ml) renferme 30 % de ^{131}I et 13 % de ^{35}S administrés. Par lyophilisation partielle, le volume est réduit à 5 ml qui sont traités par électrophorèse préparative dans les conditions suivantes : dépôt sur papier Wathman n° 3MM ($30 \times 40 \text{ cm}$), le long d'une ligne de 25 cm à raison de $20 \mu\text{l}/\text{cm}$; tampon $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, de $\text{pH} = 9$, 500 Volts, 40 mA pendant cinq heures. L'autoionophorègramme (Fig. 5,A) montre deux zones de produits radioactifs en direction de l'anode : l'une (à 15 cm de l'origine) est constituée exclusivement par $^{35}\text{SO}_4$, l'autre (de 5 à 10 cm de l'origine) renferme avec des pigments, des produits marqués par ^{131}I et ^{35}S (Fig. 5,A,1). Ces derniers sont élués partiellement (50-60 %) par du n-butanol saturé par H_2O : éluat 1, qui est chromatographié préparativement en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. Sur l'autoradiochromatogramme, deux bandes principales de composés marqués ($R_f = 0,20$ et $0,30$) sont visibles dont l'une au $R_f = 0,20$ de ST_3 (Fig. 5,B,2) qui sera éluee (80 %) par NH_4OH à 1 % (éluat 2)(1).

(1) La chromatographie ascendante en collidine-eau (100:35) en atmosphère NH_3 ne sépare pas ces différents métabolites, ainsi que le montre le radiochromatogramme de l'éluat 1 analysé dans ce solvant (Fig. 6,C).

Les radiochromatogrammes correspondants de ^{35}S et ^{131}I montrent à ce niveau l'existence de produits complexes renfermant les deux radioéléments (Fig. 6,A) et donnent une idée des proportions relatives des différents métabolites de T_3 : le glycuconjugué (GT_3), les dérivés pyruvique (TK_3) et acétique (TA_3). L'éluat 2 chromatographié en phase descendante en n-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) renferme plusieurs constituants iodés radioactifs (radiochromatogramme Fig. 6,B et autoradiogramme Fig. 5,C). Au niveau de l'un d'eux (Fig. 6,B,2) de même $R_f = 0,09$ que ST_3 de référence, on note également la présence de ^{35}S . On élue ce dérivé iodé par NH_4OH à 1 % (éluat 3) et on analyse les produits de cette élution dans un troisième solvant chromatographique : méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1,2,5) pH = 6,1 en phase ascendante. Les radiogrammes (Fig. 6,D) et autoradiogrammes (Fig. 5,D) correspondants montrent la séparation d'un produit uniquement soufré ($R_f = 0,60$) d'un autre contenant ^{131}I et des traces de ^{35}S , ce dernier au $R_f = 0,50$ de ST_3 sera élué comme précédemment : éluat 4 (Fig. 5,D,4) et (Fig. 6,D,E).

Une partie aliquote de l'éluat 4 a permis d'y individualiser ^{35}S et ^{131}I dans le rapport ^{35}S en c.min./ ^{131}I en c/min. $\neq 1/100$ (trois semaines après l'injection des animaux).

Une autre partie a été utilisée pour vérifier la pureté du produit isolé. Dans ce but, ont été effectuées une chromatographie bidimensionnelle :

- 1) n-butanol saturé par NH_4OH 2 N ;
 - 2) méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1,2,5) pH = 6,1 ;
- et une chromatoélectrophorèse :
- 1) chromatographie circulaire en BuOH saturé par NH_4OH 2 N
 - 2) électrophorèse à pH = 9 , 500 Volts, 25 mA, cinq heures
- dont les autoradiogrammes présentés dans la Fig. 5,E et F illustrent les résultats.

Avec le reste de l'éluat 4 on a cherché à établir un complément d'identification du dérivé biologique avec ST_3 de synthèse d'une part par la concordance des R_f dans divers solvants (les résultats de cette analyse sont donnés dans le tableau 2 page 29) et d'autre part, par l'analyse des produits de son hydrolyse par HCl 1 N à chaud. Celle-ci a été conduite de la manière suivante : une partie aliquote de l'éluat 4 est portée rapidement à sec sous vide et le résidu est repris par 100 μl HCl 1 N ; la solution est maintenue au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, puis portée à sec. Le résidu de cette opération repris par NH_4OH concentré est déposé sur le papier chromatographique avec comme corps de référence : $\text{ST}_3(3'-^{131}\text{I})$ de synthèse, $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, ^{131}INa et le produit de l'éluat 4 non traité. Comme le montre la Fig. 5,G le traitement ménagé par HCl à chaud a dissocié la presque totalité du produit avec libération de $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$ et de traces de $^{35}\text{SO}_4$ tout en ne déshalogénant qu'une très faible quantité de produit. Cette autoradiographie développée, nous avons mis à profit la période très différente des deux radioéléments : huit jours pour ^{131}I et 87,1 jours pour ^{35}S , de manière à démontrer plus nettement la présence de ^{35}S dans le dérivé biliaire isolé et celle de $^{35}\text{SO}_4$ dans les produits de son hydrolyse. A cette fin, le document a été mis à nouveau sous film mais cette fois pour une durée de trois mois. Sur ce second document

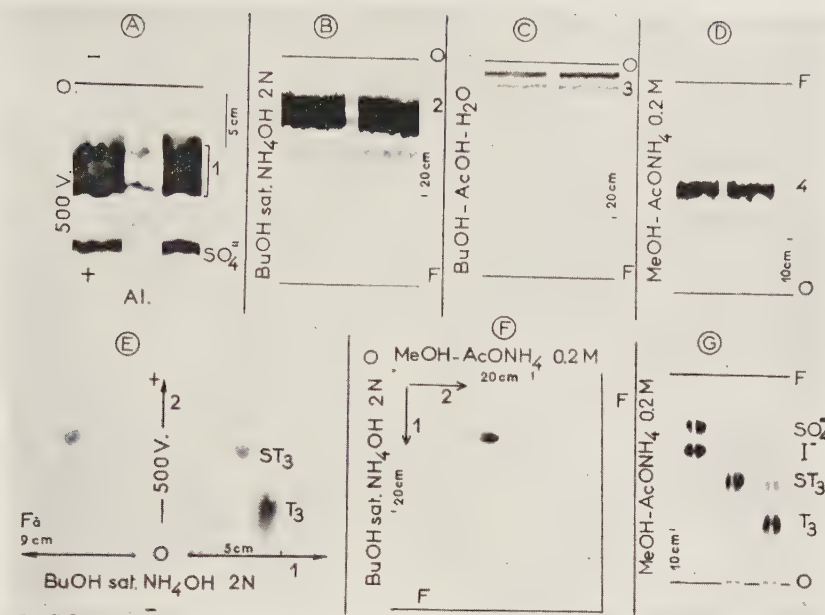


FIGURE 5.

Autoradiographies de documents obtenus avec la bile de Rats injectés de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et de 1,2 μg de T_3 ($3'$ - ^{131}I).

- Electrophorèse préparative en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$, 0,05 M, 500 V, pendant 5 heures.
- Chromatographie préparative de l'éluat 1 de A, en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.
- Chromatographie préparative en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17) de l'éluat 2 de B.
- Chromatographie ascendante de l'éluat 3 de C, en méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1 : 2,5) pH = 6,1.
- Chromatoélectrophorèse de l'éluat 4 de D : chromatographie circulaire en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (première dimension) et électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$, 0,05 M, pH = 9, 500 V, 5 heures (seconde dimension).
- Chromatographie bidimensionnelle de l'éluat 4 : n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (première dimension), méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1 : 2,5) pH = 6,1 (seconde dimension).
- Chromatographie ascendante de l'éluat 4, en méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1 : 2,5) avant (partie centrale) et après hydrolyse acide ménagée (partie droite). A gauche, $^{35}\text{SO}_4^-$ et ^{131}I de référence.

O = origine; F = front; ST_3 et T_3 = corps de référence; Al = écran d'aluminium.

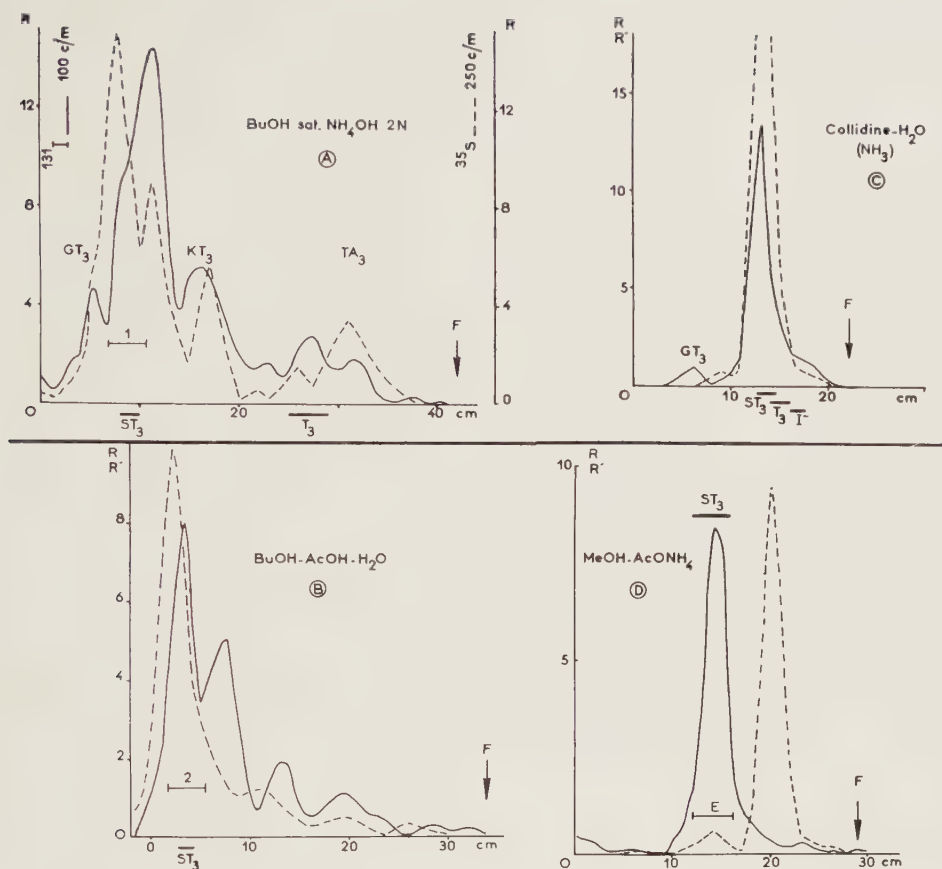


FIGURE 6.

Radiochromatogrammes différentiels de ^{131}I et ^{35}S , des produits organiques de la bile de Rat traité par 1,2 μg T_3 ($3^9\text{-}^{131}\text{I}$) et $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$:

- Chromatographie préparative descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.
- Eluat 1 de A, chromatographié en phase descendante en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17).
- Eluat 1 de A, analysé par chromatographie ascendante en collidine-eau (100 : 35) en atmosphère d' NH_3 .
- Eluat 2 de B, analysé par chromatographie ascendante en méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M, pH = 6,1 (l'éluat de la bande E correspond à l'éluat 4 de la figure précédente).

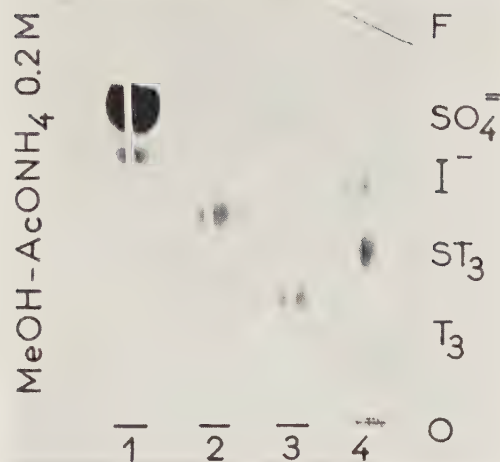


FIGURE 7.

Document semblable à celui présenté figure 5 G, mais ici le chromatogramme est resté trois mois au contact du film radiographique de manière à mettre nettement en évidence ^{35}S dans le métabolite biliaire de l'éluat 4 (2) et $^{35}\text{SO}_4$ dans les produits de son hydrolyse acide ménagée (3).

En parallèle figurent les corps de référence : $^{35}\text{SO}_4 =$ et $^{131}\text{I} -$; T_3 ($3' \cdot ^{131}\text{I}$) et ST_3 ($3' \cdot ^{131}\text{I}$) (4). Un écran sous forme d'une bandelette d'aluminium placée entre le chromatogramme et le film (1, 2, 3) et absorbant la totalité du rayonnement de ^{35}S et 50 % de celui de ^{131}I , permet de distinguer ces deux radioisotopes.

(Figure 7) les impressions dues à ^{131}I sont beaucoup plus faibles que dans le document précédent (Figure 5,G), par contre celles de ^{35}S sont devenues très nettes.

Groupe III. Quatre rats reçoivent $450 \mu\text{C } ^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et une heure plus tard, une dose pharmacologique de $\text{T}_3(^{31}-^{131}\text{I})$, soit 9 mg (2,8 $\mu\text{C}/1 \text{ mg}$). La bile qui contient 20 % de ^{131}I et 5 % de ^{35}S administrés est recueillie et analysée suivant le protocole adopté dans l'expérience précédente.

On a pu en isoler et y caractériser un métabolite de T_3 s'identifiant à l'ester sulfurique de celle-ci dans les huit solvants utilisés précédemment (Tableau 2 page 29) et par l'analyse des produits de son hydrolyse (Fig. 8 et 9). La pureté du composé a été vérifiée par chromatographies bidimensionnelles, 1, n-butanol saturé par $\text{NH}_4\text{OH } 2 \text{ N}$ et 2, méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1:2:5) $\text{pH} = 6,1$ ainsi que 1, n-butanol saturé par $\text{NH}_4\text{OH } 2 \text{ N}$ et 2, collidine-eau (100:35) en atmosphère NH_3 et ses coordonnées étaient celles de ST_3 .

Dans cette expérience on a cherché à compenser la radioactivité spécifique très faible du $^{35}\text{SO}_4$ dans l'organisme (90, 193) des animaux par un apport important de T_3 entraîneur dans le but d'isoler éventuellement de la bile, un sulfoconjugué marqué par ^{35}S et ^{131}I dans un rapport supérieur à celui qu'avait fourni l'expérience précédente. Tel fut le cas puisque ST_3 biologique obtenu était marqué par les deux radioéléments dans le rapport ^{35}S en c/min./ ^{131}I en c/min. # 3 comme en témoignent les radiochromatogrammes (Fig. 8).

Groupe IV. On administre à trois rats par voie intra-musculaire une dose de $0,03 \mu\text{g } \text{T}_3(^{31}-^{131}\text{I})$ par 100 g de poids du corps. Suivant le mode opératoire adopté dans les recherches précédentes, un produit iodé a pu en être extrait, chromatographiquement pur à l'analyse bidimensionnelle en n-butanol saturé par $\text{NH}_4\text{OH } 2 \text{ N}$ (1ère dimension) et en méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1:2:5) (seconde dimension) : autoradiogramme Fig. 10. Les coordonnées de la tache unique sont celles de ST_3 et par ailleurs la concordance des R_f a été également vérifiée en n-butanol-acide acétique-eau et en n-butanol-éthanol-eau (100:20:40) phase ascendante (Tableau 2).

Discussion

Les produits biliaires du premier groupe (I) d'animaux mis en expérience et injectés de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ seul, nous ont servi à établir un mode opératoire permettant de séparer chromatographiquement les composés biologiques marqués par ^{35}S , de ST_3 synthétique utilisé comme corps de référence. Nous avons été ainsi amené à élaborer une méthode de purification successive par électrophorèse préparative et chromatographies préparatives dans trois solvants. Les deux premiers de ceux-ci, très utilisés en biochimie thyroïdienne devaient nous aider à identifier les métabolites connus de la triiodothyronine, et faciliter l'isolement à l'état pur de son ester sulfurique dans les expériences suivantes. A

titre d'exemple, dans le premier solvant (BuOH sat. NH_4OH 2 N) ST_3 migre peu ($R_f = 0,20$) et occupe une position voisine de celle du glycuroconjugué de T_3 ($R_f = 0,12$) et de celle des iodures ($R_f = 0,30$) ; mais d'une part, les iodures sont éliminés par électrophorèse préalable, et d'autre part, GT_3 se sépare totalement de ST_3 dans le second solvant (BuOH - AcOH - H_2O) , leurs R_f respectifs étant de 0,70 et 0,10.

Nous avons isolé de la bile des rats du second groupe, traité par 1,2 μg de $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$ et 450 μC $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, un dérivé qui a été identifié à ST_3 par électrophorèse et chromatographie dans huit solvants. Marqué par ^{131}I et ^{35}S , il régénère après hydrolyse acide ménagée $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$ et $^{35}\text{SO}_4^-$. Ce dérivé biliaire de $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$ est donc l'ester sulfurique $\text{ST}_3(3'-^{131}\text{I})$. Le rapport $^{35}\text{S}/^{131}\text{I}$ très faible dans cette molécule, a été obtenu supérieur à l'unité, en ajoutant à l'administration de $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$ une forte dose (9 mg) d'entraîneur (groupe III), compensant la radioactivité spécifique très faible de $^{35}\text{SO}_4^-$ dans les humeurs (90, 193). Dans ce cas, l'identification des deux radioéléments a été facile avant et après hydrolyse du produit, et le changement de son rapport $^{35}\text{S}/^{131}\text{I}$ au cours des deux essais, constitue un argument indirect en faveur de son identification avec $\text{ST}_3(3'-^{131}\text{I})(^{35}\text{SO}_3\text{H}-)$. La quatrième expérience (groupe IV) a été menée dans des conditions rigoureusement physiologiques, les animaux ayant reçu 0,03 μg de $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$ par 100 g de poids. Des produits de leur excrétion biliaire, un métabolite iodé a été extrait à l'état pur qui s'est identifié à ST_3 de synthèse dans quatre solvants chromatographiques. Or, dans ces conditions expérimentales, la formation de ST_3 n'était certainement pas liée au caractère toxique de la dose d'hormone injectée. En effet on a évalué à environ 2 $\mu\text{g}/100$ g de poids du corps la quantité de T_4 sécrétée par jour par la thyroïde d'un rat normal (47, 134, 222). On peut donc admettre qu'une dose de T_4 dix fois supérieure par exemple est encore physiologique pour un rat hypothyroïdien depuis plusieurs semaines, ce qui correspondrait à une sécrétion d'environ 0,4 $\mu\text{g}/30$ min. En ce qui concerne la sécrétion normale de T_3 , on ne possède pas de renseignements mais on sait que son activité biologique est cinq à dix fois supérieure à celle de T_4 . Il est donc raisonnable de considérer qu'avec T_3 , une dose physiologique doit être approximativement dix fois plus faible. Or nos animaux ont reçu 0,03 $\mu\text{g}/100$ g, quantité en solution dans 0,5 ml et non résorbée totalement après 30 minutes comme nous avons aisément pu le vérifier.

On peut donc conclure de ces expériences complémentaires, que ST_3 est un produit biliaire du métabolisme de T_3 . Il apparaît en quantité importante dans des conditions physiologiques alors que le glycuroconjugué existe seulement à l'état de trace, et cette observation permet d'envisager un rôle biologique différent pour ces deux produits de conjugaison de l'hormone.

*

*

*

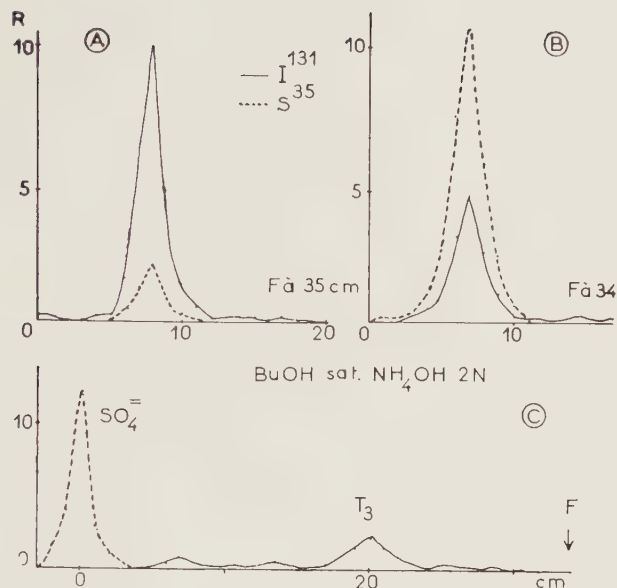


FIGURE 8.

Radiochromatogrammes différentiels de ^{35}S et ^{131}I du produit de l'éluat 4 de l'expérience III, chromatographié en phase descendante en *n*-butanol saturé par NH_4OH 2 N :

- A. Produit de l'éluat 4 de l'expérience II, c'est-à-dire isolé de la bile de rats injectés de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et 1,2 μg T_3 ($3'\text{-}^{131}\text{I}$), et présenté ici à titre de comparaison.
- B. Produit de l'éluat 4 de l'expérience III, c'est-à-dire extrait de la bile de rats injectés de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et 9 mg T_3 ($3'\text{-}^{131}\text{I}$).
- C. Même produit qu'en B, mais après hydrolyse acide ménagée.

Ordonnées : radioactivité (R) en 10^2 c/min. Abscisses : longueur en cm à partir de l'origine.

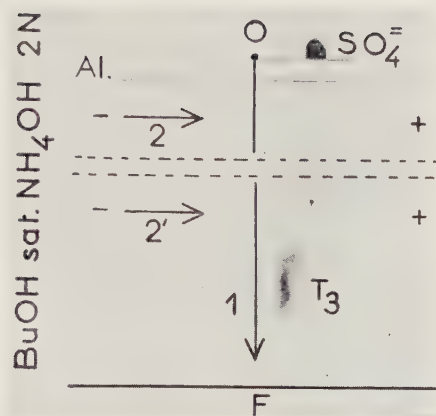


FIGURE 9.

Autoradiochromatoélectrophorègramme des produits de l'hydrolyse acide ménagée du métabolite purifié (éluat 4, expérience III) extrait de la bile de rats traités par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et 9 mg T_3 ($3',^{131}\text{I}$) :

1. Première dimension : chromatographie descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.
2. Seconde dimension : électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,2 M, pH = 9, 200 V, 20 mA, deux heures, sur le tiers supérieur du chromatogramme.
- 2'. Seconde dimension : électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, pH = 9, 500 V, 30 mA, pendant cinq heures, sur les deux tiers inférieurs du chromatogramme.

Al : écran d'aluminium (20 mg/cm^2) interposé entre le film et le document.

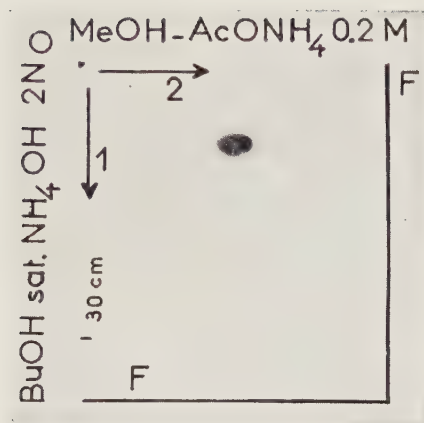


FIGURE 10.

Autoradiochromatogramme du métabolite purifié (éluat 4, expérience IV), extrait de la bile de rats traités par $0,03 \mu\text{g } T_3 (3^3\text{-}^{131}\text{I})$ et analysé par chromatographie bidimensionnelle : descendante en n-butanol saturé par $\text{NH}_4\text{OH } 2 \text{ N}$ (première dimension) et ascendante en méthanol-acétate d'ammonium $0,2 \text{ M}$, $\text{pH} = 6,1$ (seconde dimension).

Tableau 2

R_f à 18°C

Solvants (207)	Produits analysés	(1) GT ₃	(2) ST ₃	Eluat 4 des expériences :		
				II	III	IV
n-BuOH saturé par NH ₄ OH 2 N descendant (45)		0,12	0,20	0,22	0,21	0,20
n-BuOH-AcOH-H ₂ O (78:5:17) (descendant) (145)		0,70	0,09	0,10	0,07	0,10
MeOH-AcONH ₄ 0,2 M (1;2:5) (ascendant) (165)		-	0,50	0,50	0,49	0,49
Collidine-H ₂ O (100:35) atm. NH ₃ (ascendant) (201)		0,28	0,65	0,64	0,67	-
tert. PeOH-NH ₄ OH 2 N (circulaire) (166)		-	0,26	0,24	-	-
n-BuOH-EtOH-H ₂ O (100:20:40) (ascendant) (209)		-	0,38	0,40	0,43	0,39
PrOH-NH ₄ OH 0,15 N (100:50) (ascendant) (209)		-	0,76	0,74	0,76	-
n-BuOH-EtOH-NH ₄ OH 2 N (100:20:40) (ascendant) (209)		-	0,40	0,41	0,42	-

Résumé

Nous avons isolé de la bile et identifié l'ester sulfurique de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine marquée par ³⁵S et ¹³¹I - soit ST₃(3'-¹³¹I) (³⁵SO₃H-) - chez le Rat thyroïdectomisé, préalablement injecté de ³⁵SO₄Na₂ et traité par des doses physiologiques ou non de l'hormone marquée en 3' par ¹³¹I - soit T₃(3'-¹³¹I).

L'identification repose sur la correspondance des R_f du produit biologique avec ceux de ST₃ de synthèse dans huit solvants chromatographiques; sur la similitude de leur comportement ionophorétique et sur l'identité de leurs produits d'hydrolyse, laquelle régénère T₃ et SO₄⁼.

(1) d'origine biologique.

(2) de synthèse.

Nous avons démontré que l'ester sulfurique de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine est un des métabolites naturels de l'hormone excrétée par la bile. Processus nouveau dans le métabolisme des iodothyronines, lequel évolue simultanément mais avec des vitesses différentes, par désalogénation, par dégradation de la chaîne alanyl et par conjugaison de l'hydroxyle phénolique avec l'acide glycuronique ou avec l'acide sulfurique, ces deux types de conjugaison paraissant jouer un rôle biologique différent.

Tableau 3

Identification de ST₃ biologique : protocole expérimental

Groupe I : rats traités par ³⁵SO₄Na₂. Analyse chromatographique comparée des produits biliaires organiques marqués par ³⁵S et de ST₃ de synthèse, en vue de la séparation de ce dernier dans la bile des animaux des autres groupes.

Rats traités par :		
<u>Groupe II</u>	<u>Groupe III</u>	<u>Groupe IV</u>
³⁵ SO ₄ Na ₂	³⁵ SO ₄ Na ₂	0,05 µg
+ 1 µg T ₃ (3'- ¹³¹ I)	+ 9 mg T ₃ (3'- ¹³¹ I)	T ₃ (3'- ¹³¹ I)

↓
Bile

↓
Electrophorèse préparative
Elution des composés organiques marqués :

éluat 1

↓
Chromatographie préparative en BuOH sat. NH₄OH 2 N
Elution de la zone au R_f de ST₃ :

éluat 2

↓
Chromatographie préparative en BuOH-AcOH-H₂O
Elution de la zone au R_f de ST₃ :

éluat 3

↓
Chromatographie préparative en MeOH-AcONH₄ 0,2 M
Elution de la zone au R_f de ST₃ :

éluat 4

↓
Analyse comparative avec ST₃ de synthèse par :
chromatographie bidimensionnelle ou chromatoélectrophorèse,
chromatographie dans différents solvants,
et analyse des produits de l'hydrolyse acide.

CHAPITRE III

Identification de ST_3 dans le plasma du Rat thyroïdectomisé traité par T_3

Divers auteurs (7, 40, 43, 52, 54, 156) ont étudié la nature des métabolites sanguins de T_4 et de T_3 : en plus des iodures et de l'hormone inchangée, des traces d'acide triiodothyroacétique ont été signalées après administration de l'une (40, 43) de ces hormones, ainsi que des produits non identifiés dont l'un d'eux semble être un dérivé commun à T_4 et T_3 (57).

Dans le plasma du Rat on a mis en évidence un produit semblable dont la migration est voisine de celle des iodures en chromatographie en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (156).

Chez le Lapin, l'injection de T_3 donne lieu à l'apparition dans le sang d'un "complexe" de l'hormone régénérant celle-ci par l'hydrolyse acide et dont le R_f en n-butanol-dioxane- NH_4OH 2 N est proche de celui de I^- (57). Ce dérivé peut sans doute être rapproché d'un des métabolites des hormones tétra- et triiodées qui circulent dans le sang du Chien hépatectomisé et néphrectomisé (40). Il se sépare peu des iodures en chromatographie bidimensionnelle en

- 1) n-butanol-dioxane- NH_4OH 2 N et
- 2) pentanol tertiaire - NH_4OH 2 N

et par ailleurs il présente une migration électrophorétique importante à pH alcalin (40).

De ces observations il ressortait qu'un des métabolites sanguins des iodothyronines possédait des propriétés chromatographiques et électrophorétiques analogues à celles de l'ester sulfurique de T_3 préparé et caractérisé par nous. Son identification à ce dernier constitue l'objet de cette partie de notre travail. Le fait qu'il paraît commun à T_4 et à T_3 en souligne l'importance.

Mode opératoire

Quinze rats ♂ de 150-200 g thyroïdectomisés depuis trois semaines reçoivent par voie intra-musculaire, et par animal, 150 μC de $^{35}SO_4Na_2$ sans entraîneur et par 100 g de poids 0,25 μg de $T_3(3I-^{131}I)$ (55 $\mu C/\mu g$), répartis en trois injections égales successives faites une, deux et demi et quatre heures après celle du radiosulfate.

Les animaux, au préalable héparinés sont sacrifiés par saignée six heures après le début du traitement hormonal. Le plasma (39 ml) décanté par centrifugation, renfermait 2 % de ^{131}I et 0,45 % de ^{35}S administrés. Après lyophilisation, le résidu plasmatique pulvérulent est délipidé par 100 ml d'un mélange anhydre de 95 % d'éther (dépéroxydé par

le sulfate ferreux) et 5 % d'éthanol absolu. La poudre ainsi obtenue (75 % de ^{131}I initial) est mise en suspension dans 8 ml d' H_2O versés goutte à goutte sous agitation, et est ensuite dissoute avec les mêmes précautions par addition de 4 ml de NH_4OH 0,5 N. Les protéines sont alors progressivement précipitées par 30 ml d'éthanol absolu pur. Le mélange, abandonné une demi-heure, est ultérieurement centrifugé et la phase liquide prélevée. Par quatre extractions ammoniacales semblables, successives, on recueille 90 % du ^{131}I du lyophilisat. Aux extraits réunis on ajoute un volume égal de chloroforme et 30 ml de NH_4OH 2 N. Ce mélange, après avoir été bien agité, se sépare par centrifugation en deux couches. L'une supérieure et claire, est recueillie (62 ml) qui contient 84 % du ^{131}I , tandis que 6 % seulement sont passés dans la phase chloroformique jaune et dans l'interphase lipido-protéique. Les opérations décrites ci-dessus sont toutes conduites à basse température.

Analyse des produits extraits du plasma

L'extrait final clair et incolore ainsi obtenu est concentré jusqu'à 6 ml sous pression réduite en atmosphère d'azote et à une température inférieure à 40°C. Une portion aliquote est utilisée pour évaluer les quantités relatives des composés organiques et minéraux marqués par ^{35}S et par ^{131}I . Les premiers, lors de l'électrophorèse sous 200 Volts, 20 mA, pendant deux heures à $\text{pH} = 9$ (tampon $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,2 M), demeurent à l'origine bien séparés des anions qui migrent respectivement à 10 et 7 cm. De cette manière on a pu établir que 10 % de la radioactivité totale due à ^{131}I revenaient aux iodures et que 95 % de celle de ^{35}S étaient apportés par des sulfates. Le reste de l'extrait concentré a été fractionné en vue de l'identification de ST_3 , suivant le protocole expérimental élaboré au chapitre précédent pour son identification dans la bile, ST_3 de synthèse servant de corps de référence.

L'extrait a été déposé sur papier Whatman n° 3MM, le long d'une ligne de 40 cm en vue d'une électrophorèse préparative en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M à $\text{pH} = 9$ sous 500 Volts et 40 mA pendant cinq heures. Les produits organiques (Fig. 11,A,1) sont séparés ⁽¹⁾. Cet éluat contenant 90 % des produits iodés radioactifs (éluat 1) a été chromatographié en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. L'autoradiochromatogramme (Fig. 11,B) révèle l'existence de cinq produits, iodés puisqu'ayant

(1)

Cette fois nous avons élué par NH_4OH à 1 %, alors que dans le cas de la bile, nous avons utilisé du n-butanol saturé d'eau ammoniacale. En effet, avec le premier solvant, on élue presque quantitativement les dérivés marqués alors qu'avec le second ils ne sont récupérés qu'à 60-70 %. Cependant, ce dernier solvant est plus intéressant dans le cas de produits ou d'extraits chargés de pigments car il les entraîne beaucoup moins que le premier. Or, les pigments sont très gênants pour les chromatographies ultérieures, retenant ou entraînant par adsorption sans doute, les Iodothyronines et leurs dérivés présents en quantité infime dans les humeurs et par conséquent, dans leurs extraits.

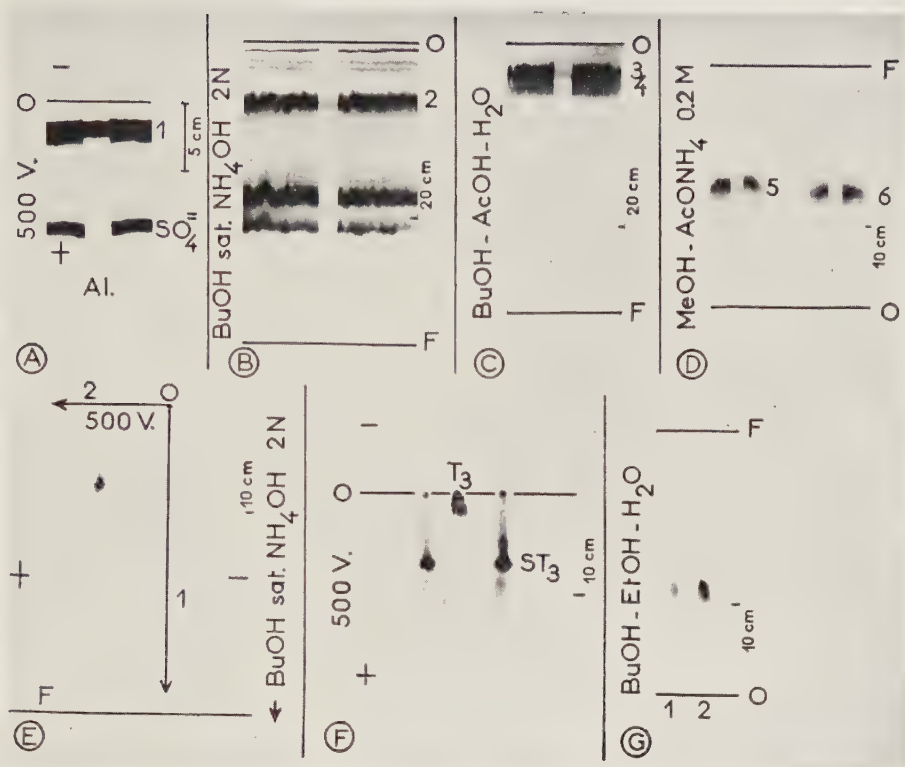


FIGURE 11.

- A. Autoradiogramme du produit de l'électrophorèse préparative ($\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$, 0,05 M, pH = 9, sous 500 V, 40 mA, pendant 5 heures) de l'extrait du plasma de rats injectés de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et de T_3 ($3 \cdot 10^{11}\text{I}$).
- B. Autoradiochromatogramme de l'éluat 1 de A, analysé en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (phase descendante).
- C. Autoradiochromatogramme de l'éluat 2 de B, analysé en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17) (phase descendante).
- D. Autoradiochromatogramme des éluats 3 et 4 de C, analysés en méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1 : 2,5), pH = 6,1 (phase ascendante).
- E. Autoradiochromatoélectrophorégramme des produits 5 + 6 élués de D : chromatographie en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (première dimension) et électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$, 0,05 M, pH = 9, 500 V, 30 mA, pendant cinq heures (seconde dimension).
- F. Autoradioionophorégramme comparant le produit des éluats 5 + 6 de D avec T_3 et ST_3 de synthèse.
- G. Autoradiochromatogramme de l'éluat 5 + 6 de D analysé en n-butanol-éthanol-eau (100 : 20 : 40) en phase ascendante (2) avec ST_3 de synthèse en parallèle comme corps de référence (1).

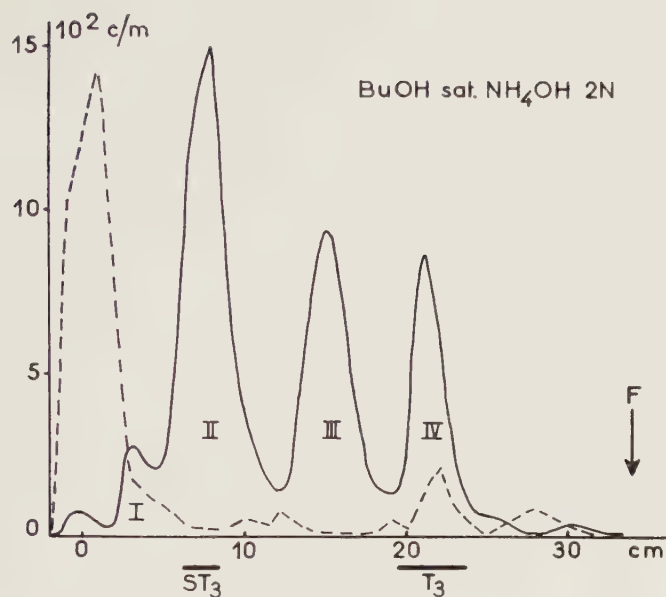


FIGURE 12.

Radiochromatogrammes différentiels de ^{35}S et ^{131}I de l'extrait plasmatique de rats traités par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et $0,25 \mu\text{g}$ T_3 ($3'\text{-}^{131}\text{I}$), analysé en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N après une première purification par électrophorèse préparative.

Ordonnées : radioactivité en coups/minute.

Abscisses : longueur en cm à partir de l'origine.

impressionné le film à travers l'écran d'aluminium (20 mg/cm²). Ils ne sont accompagnés que de faibles quantités de dérivés soufrés radioactifs ainsi qu'en témoigne le radiochromatogramme (Fig. 12) qui - en raison des extractions presque quantitatives - permet de chiffrer leurs proportions relatives avec une approximation satisfaisante. Les deux premiers (Fig. 12,1) voisins de l'origine existent en quantités négligeables (moins 10 %) et n'ont pu être identifiés (l'un d'eux a le $R_f = 0,10$ du glycuconjugué de T_3). Le troisième (Fig. 12,II), le plus important, (30-40 %) a un $R_f = 0,20$ semblable à celui de ST_3 témoin en parallèle et fera l'objet des analyses ultérieures. Celui de $R_f = 0,60$ (Fig. 12,IV) est constitué par T_3 non métabolisé. Il en est de même du composé précédent (III) de $R_f = 0,50$, identifié après élution, par analyse chromatographique en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N et en pentanol tertiaire saturé par NH_4OH 2 N, ainsi que par électrophorèse à pH = 9 sous 500 Volts. (Tableau 4)

Tableau 4

R_f à 18°C

Solvants	Produits	Corps III	Corps IV	T_3	T_2	TA_2
n-BuOH saturé par NH_4OH 2 N		0,63	0,62	0,63	0,55	0,67
tert. PeOH saturé par NH_4OH 2 N		0,55	0,55	0,56	0,38	0,60
Electrophorèse $CO_3(NH_4)_2$ 0,05 M pH = 9, 500 V. 5 heures	Migration vers l'anode en cm					
		0,5	0	0	-	9,5

L'éluat par NH_4OH à 1 % du dérivé iodé de $R_f = 0,20$ (Fig. 11,B,2) est soumis à une chromatographie descendante en n-butanol-acide acétique-eau (78:5:17). L'autoradiochromatogramme présente deux bandes radioactives de produits iodés mal séparés accompagnés de ^{35}S à l'état de traces, dont la seconde (Fig. 11,C,4) occupe une position identique à celle de ST_3 . Elles sont l'une et l'autre éluées par NH_4OH à 1 % (éluat 3 et 4) et leurs produits sont chromatographiés séparément en phase ascendante en méthanol-acétate d'ammonium 0,2 M (1,2,5) pH = 6,1. Les autoradiographies de ces documents (Fig. 11,D) montrent que les éluats 3 et 4 renferment un même composé marqué par ^{131}I au $R_f = 0,50$ de ST_3 ; il est présent à l'état pur dans le premier (Fig. 11,D,5) et accompagné d'un produit à l'état de traces marqué par ^{35}S ($R_f = 0,60$) dans le second (Fig. 11,D,6).

Les liquides d'élution des bandes 5 et 6 ont été rassemblés et leur teneur en ^{35}S a été évaluée par rapport à celle en ^{131}I , au

moyen d'une double mesure de radioactivité avec et sans écran d'Al. sur plusieurs échantillons secs de poids négligeable : ^{35}S en c/min./ ^{131}I en c/min. $\# 1/200$. Cet extrait final renferme un produit pur ainsi qu'en témoigne son analyse par chromat électrophorèse : première dimension, n-butanol saturé par NH_4OH 2 N et seconde dimension, électrophorèse sous 500 Volts, 30 mA, en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M pendant cinq heures (Fig. 11,E). Les coordonnées de la tache radioactive sont celles de ST_3 et la concordance des R_f de ces deux produits a été vérifiée également dans un quatrième solvant, le n-butanol-éthanol- H_2O (100:20:40) en phase ascendante (Fig. 11,G).

Une partie aliquote de l'éluat 5 + 6 a été traitée après évaporation, par ClH 1 N, 10 minutes au bain-marie à l'ébullition et le résidu sec repris par NH_4OH a été analysé en n-butanol ammoniacal.

Le radiochromatogramme correspondant montre essentiellement un sommet étalé aux R_f de T_3 et T_2 témoins (Fig. 13,B).

Discussion

Nous avons traité des rats hypothyroïdiens ayant reçu une heure auparavant 150 μC de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, par $\text{T}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ injecté en 3 fois 0,08 $\mu\text{g}/100$ g à une heure et demi d'intervalle. Nous nous sommes donc placés dans des conditions que l'on peut considérer physiologiques (voir discussion Ch. I p. 28). Le plasma prélevé quelques heures plus tard renferme à côté des produits marqués par ^{35}S (95 % de $^{35}\text{SO}_4^{=}$) des corps iodés : $\text{T}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ non métabolisé (40-45 %), des traces de $\text{GT}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ (2-4 %), $^{131}\text{I}^-$ (10 %) et un métabolite marqué par ^{131}I présent en quantité importante (30-40 %). Ce dernier, après élimination électrophorétique des sels minéraux, est séparé et purifié par trois chromatographies successives dans lesquelles il se comporte comme ST_3 de référence. Son identification à celui-ci se vérifie également dans un quatrième solvant chromatographique et en électrophorèse à $\text{pH} = 9$ sous 500 Volts. Obtenu à l'état pur comme en fait preuve l'autoradiographie d'un chromat électrophorègramme, il régénère $\text{T}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ après hydrolyse acide ménagée. [La présence de $\text{T}_2(3'\text{-}^{131}\text{I})$ résulte sans doute de la déshalogénation partielle de $\text{T}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ au cours de l'opération]. Par ailleurs, il est marqué par ^{131}I et ^{35}S mais avec une activité spécifique en ^{35}S trop faible pour permettre l'identification certaine de $^{35}\text{SO}_4^{=}$ dans les produits de son hydrolyse, d'autant plus que la teneur sanguine de ce dérivé de T_3 est faible. Nous avons en effet évalué à 2 % de la dose administrée sous forme de $\text{T}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$, la radioactivité totale en ^{131}I du plasma obtenu, et ce métabolite en représente le tiers environ.

Les résultats de cette étude nous permettent d'identifier ce dérivé de T_3 à l'ester sulfurique correspondant ST_3 , lequel constitue donc à côté des iodures, le métabolite principal de l'hormone présent dans le plasma. Sa présence dans le sang suggère différentes hypothèses. On peut envisager la sécrétion sanguine directe de ST_3 par la cellule hépatique dans laquelle il se forme sans doute principalement. On doit

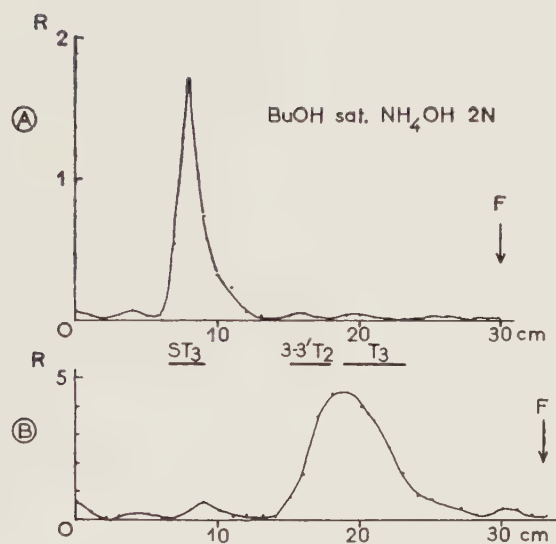


FIGURE 13.

Radiochromatogramme du produit extrait du plasma des rats traités par T₃ (3².¹³¹I), éluat 5 + 6 (fig. 11), analysé en phase descendante en n-butanol saturé par NH₄OH 2 N, avant (A) et après hydrolyse acide ménagée (B).

R : radioactivité en 10² C/min.

également considérer qu'il puisse se former, ainsi que les glycuconjugués (16, 38, 39, 40, 52), dans les tissus extrahépatiques et être déversé par eux dans le sang; cependant il est vraisemblable que l'intervention de ces derniers est faible par rapport à celle du foie. Enfin on doit envisager que ST_3 sanguin puisse provenir de la résorption intestinale de celui-ci secrété avec la bile dans le tube digestif. Quoiqu'il en soit, la signification biologique de la sulfoconjugaison semble être différente de celle accordée à la glycuconjugaison. Cette dernière apparaît directement liée à un processus de détoxication, régulateur de l'hormonémie. En effet GT_3 est éliminé par la bile en quantité proportionnelle au taux de la triiodothyronémie (153, 156) mais quelle qu'elle soit, le glycuconjugué déversé dans l'intestin ne passe qu'à l'état de traces dans le sang lorsque les voies biliaires sont perméables (7, 40, 43, 57, 156). Par contre nous avons vu que ST_3 se formait en quantité importante même avec une triiodothyronémie normale et que dans ces conditions, sa teneur relative dans le sang était élevée, tout comme si la sulfoconjugaison ne favorisait pas l'excrétion de la molécule ou donnait lieu à une résorption intestinale de son produit.

Résumé

Chez le Rat thyroïdectomisé et traité par $^{35}SO_4Na_2$ suivi d'une dose physiologique de l'hormone thyroïdienne triiodée $T_3(3'-^{131}I)$, nous avons extrait du plasma et identifié l'ester sulfurique de celle-ci : $ST_3(3'-^{131}I)(^{35}SO_3H-)$. L'identification a été établie par la concordance des R_f du produit biologique avec ceux de ST_3 de synthèse dans quatre solvants chromatographiques, par celle de leur migration électrophorétique et par l'analyse des produits de leur hydrolyse acide ménagée laquelle libère T_3 dans les deux cas.

Nous avons établi que ce sulfoconjugué constitue à côté des iodures, le principal métabolite circulant de T_3 , puisque par ailleurs, seules des traces possibles de glycuconjugué ont été observées.

Le comportement différent de ces deux types de conjugués a été signalé.

CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE

Divers travaux signalaient l'existence de dérivés métaboliques non identifiés de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3). Celle-ci subit dans l'organisme, entre autres, une conjugaison de son hydroxyle phénolique avec l'acide glycuronique. On pouvait envisager qu'elle donne lieu également - ainsi que les phénols en général - à une estérification sulfurique et que le produit de celle-ci était l'un des métabolites observés. Nous nous sommes proposé de vérifier cette hypothèse. Dans

ce but, nous avons préparé l'ester sulfurique de T_3 (ST_3) et $ST_3(3'-^{131}I)$ corps dont la synthèse n'avait pas encore été réalisée et qui devaient nous servir de référence dans nos recherches biologiques. Certaines propriétés chromatographiques et électrophorétiques de ce produit ont été précisées et comparées à celles de son précurseur chimique T_3 , ce qui devait nous permettre d'établir une méthode analytique en vue de l'identification éventuelle de ST_3 dans les humeurs de l'animal traité par l'hormone correspondante. Chez le Rat traité par $^{35}SO_4Na_2$ et une dose physiologique de $T_3(3'-^{131}I)$, nous avons pu isoler de la sécrétion biliaire un métabolite important de l'hormone injectée, lequel était marqué simultanément par ^{131}I et ^{35}S . Grâce à une électrophorèse et trois chromatographies préparatives successives dans des solvants différents, avec élution de la bande radioactive au R_f de ST_3 témoin, ce dérivé a été obtenu pur et a été identifié à $ST_3(3'-^{131}I)-(^{35}SO_3H-)$.

Une nouvelle voie métabolique des hormones thyroïdiennes était donc mise en évidence et nous avons établi que dans des conditions physiologiques, T_3 était conjugué de manière importante avec l'acide sulfurique, alors que la glycuconjugaison n'intéressait apparemment qu'une faible proportion de l'hormone injectée.

On avait antérieurement rapporté l'existence dans le sang d'un métabolite non identifié de T_3 , "complexe" facilement hydrolysable de l'hormone. Nous nous sommes demandé s'il ne s'agissait pas de ST_3 , provenant soit d'une sécrétion hépatique directe, soit d'une sulfoconjugaison extrahépatique de l'hormone, soit encore des produits biliaires de son métabolisme résorbés partiellement par l'intestin. Par une technique semblable à celle élaborée pour l'étude des produits biliaires, nous avons identifié dans le plasma du Rat traité par $^{35}SO_4Na_2$ et une dose physiologique de $T_3(3'-^{131}I)$, deux dérivés organiques principaux : l'hormone injectée et son ester sulfurique ce dernier marqué par les deux radioéléments, $ST_3(3'-^{131}I)(^{35}SO_3H-)$.

Nous avons donc établi que T_3 , dans des conditions normales, subit une sulfoconjugaison au niveau de l'OH phénolique de sa molécule. Nous avons observé que ce nouveau processus dans le métabolisme des iodothyronines, était quantitativement important par rapport à la glycuconjugaison, tout au moins en ce qui concerne T_3 administré à dose physiologique. Ces faits et la présence de ST_3 dans le sang de l'animal dans des conditions normales nous ont permis d'envisager un rôle biologique différent pour ces deux types de conjugués.

Nous nous sommes alors demandé si l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique, dérivé naturel de T_3 dont l'importance biologique a été signalée (18, 33, 118, 129, 212, 213, 214, 215), présentait les mêmes particularités que son précurseur hormonal en ce qui concerne sa conjugaison. Nous avons donc recherché l'existence éventuelle de l'ester sulfurique de TA_3 (STA_3) dans les produits biliaires du métabolisme de TA_3 et dans les constituants plasmatiques qui apparaissent après son administration. La nature des dérivés éliminés par les urines dans ces conditions étant peu connue, nous nous sommes proposé de la préciser. Ces recherches font l'objet de la seconde partie de notre travail.

Il pourrait paraître étonnant que nous n'ayons pas envisagé la question de savoir si la thyroxine, hormone principale sécrétée par la thyroïde, subissait ou non l'estérification sulfurique comme T_3 . En fait, des travaux antérieurs sur le métabolisme de T_4 , avaient montré que le dérivé biliaire principal de celle-ci était le glycuconjugué (GT_4) accompagné de quantités variables d'acide 3,5,3',5'-tétra-iodothyropyruvique (41, 161, 204, 205). Par ailleurs après administration de doses physiologiques de T_4 , les produits biliaires sont presque exclusivement constitués de GT_4 . Il en résulte donc que, si la sulfoconjugaison de T_4 existe, elle ne peut intéresser qu'une fraction infime de l'hormone et ce processus devient très difficile sinon impossible à mettre en évidence.

DEUXIEME PARTIE

Sulfoconjugaison de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA₃)

INTRODUCTION

L'existence dans les produits biliaires et urinaires du catabolisme de T₄ et de T₃, des acides iodothyropyruviques correspondants (TK₄ et TK₃) (158, 160, 161) permettait d'envisager une décarboxylation ultérieure de ceux-ci avec formation d'acides iodothyroacétiques. Effectivement, l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA₃) a été identifié après administration de l'hormone thyroïdienne triiodée (T₃), dans le rein (173, 177), le muscle (175), la bile et dans le sang (40, 43). Par ailleurs, cette désamino-décarboxylation oxydative a été également démontrée in vitro par incubation du chondriome rénal en présence de T₃ (4, 95).

L'intérêt de cette voie métabolique s'est rapidement accru au cours de ces dernières années, par nombre de travaux qui devaient attirer l'attention sur les activités biologiques de ses produits et en particulier de TA₃. Celui-ci en effet, s'est avéré actif in vivo sur la consommation d'oxygène qu'il augmente - dans certaines conditions posologiques - sans temps de latence (30, 33, 129, 212, 213, 214). Il intervient par ailleurs - de même que les iodothyronines - mais à un moindre degré, dans le métabolisme du cholestérol (48, 106, 118, 219) et in vitro, sur des coupes de tissus (212, 213, 215) ou des suspensions mitochondriales (30). Ses activités présentent donc de grandes analogies avec celles de son précurseur biologique (18, 214). De telles observations - en dépit de certaines controverses (8) et bien qu'encore incomplètes et d'interprétation parfois difficile - ont amené à concevoir la pluralité des effecteurs thyroïdiens constitués non seulement par les hormones proprement dites c'est-à-dire, par les produits directs de la sécrétion glandulaire, mais encore par certains de leurs dérivés naturels : l'acide triiodothyroacétique, entre autres, dont il importait par conséquent de suivre le métabolisme. Il a été ainsi établi que TA₃ injecté à dose physiologique, se distribue aux organes et tissus, à de faibles différences quantitatives près, d'une manière semblable à l'hormone correspondante (41, 99, 173, 176). Il est en effet rapidement et principalement concentré dans le foie et les reins, phénomène en rapport avec un métabolisme et une excrétion importante au niveau de ces organes. En 24 heures, près de 60 % de l'iode qu'il renferme sont excrétés

avec la bile dans laquelle on a identifié des iodures à l'état de traces, TA_3 inchangé et le glycuconjugué de celui-ci (GTA_3), produits présents à côté d'autres métabolites non caractérisés (41, 176). Pendant le même temps, l'élimination urinaire représente environ 20 % de l'iode injecté sous forme de TA_3 (173) mais la nature de ses produits n'est pas connue et on ne possède pas davantage de renseignements sur la nature des dérivés qui apparaissent dans le sang dans semblables conditions expérimentales. Il était donc intéressant de poursuivre l'étude du métabolisme de TA_3 , parallèlement à celle qui a été conduite pour son précurseur. Nous nous sommes proposé de rechercher l'existence éventuelle de son ester sulfurique dans la bile et dans le sang ainsi que d'analyser ses dérivés iodés urinaires. Ces recherches sont exposées dans cette partie de notre travail. Elles ont été possibles grâce à la préparation de l'ester sulfurique de TA_3 (STA_3) qui nous a servi de corps de référence et dont la synthèse sera tout d'abord décrite.

* *

*

CHAPITRE I

Préparation et caractérisation de l'ester sulfurique de TA_3 (STA_3)

En modifiant la technique décrite pour la préparation de l'ester sulfurique de la tyrosine (136), nous avons pu avec un rendement satisfaisant, obtenir l'ester sulfurique de T_3 . Nous avons donc cherché à préparer l'ester sulfurique de TA_3 par la même méthode. Il nous est immédiatement apparu que dans ce cas, la réaction était plus difficile et dès lors, nous nous sommes limité à une microsynthèse à partir de $TA_3(3'-^{131}I)$ traité par SO_4H_2 concentré à froid. La préparation de TA_3 marqué par ^{131}I a été réalisée d'une manière semblable à celle de $T_3(3'-^{131}I)$: nous signalerons seulement les conditions de cette ioduration et les résultats obtenus pour décrire de manière plus précise la préparation de $STA_3(3'-^{131}I)$, son identification et sa caractérisation.

1. PREPARATION DE $TA_3(3'-^{131}I)$

La préparation de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA_3) marqué en 3' par ^{131}I a été effectuée par ioduration de l'acide 3,5-diiodothyroacétique (TA_2), suivant le mode opératoire décrit pour la synthèse de T_3 marquée et dans des conditions semblables. L'ioduration a été opérée sur des quantités de TA_2 de 25 à 250 μg traités par 2,7 à 3 atomes de $^{127}I_2$ par molécule de dérivé acétique. L'iode était marqué par réaction d'échange en milieu acide avec 4 à 15 mC de ^{131}INa . Les produits de la réaction se trouvaient en solution dans un volume total de 80 à 200 μl et ont été séparés par électrophorèse et chromatographie successives. Dans ces conditions, nous avons obtenu, avec des rendements de 20 à 30 % du théorique, $TA_3(3'-^{131}I)$ d'une activité spécifique comprise entre 26 et 44 $\mu C/\mu g$.

2. ESTERIFICATION SULFURIQUE DE $TA_3(3'-^{131}I)$

Le principe de la réaction mise en oeuvre pour la préparation de $STA_3(3'-^{131}I)$ et le mode opératoire de celle-ci ont été ceux appliqués pour l'estérification sulfurique de $T_3(3'-^{131}I)$: nous nous limiterons donc à en faire une description sommaire. La séparation des produits du milieu réactionnel et l'identification de STA_3 seront exposés en détail.

Mode opératoire

Nous avons tout d'abord effectué un premier essai à partir de 100 μ l SO_4H_2 pur ($D = 1,84$) et 300 μ g d'acide 3,5,3'-triiodothyro-acétique marqués en 3' par 10 μ C de ^{131}I adsorbés sur 300 mg de poudre de verre. Les produits de la réaction, après hydratation en phase solide par congélation et neutralisation par NH_4OH jusqu'à $\text{pH} = 9$, ont été soumis à une analyse chromatographique descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. Sur l'autoradiochromatogramme correspondant, la presque totalité de la radioactivité était rassemblée dans une zone au R_f de TA_3 . Dans ces conditions expérimentales, la sulfoconjugaison ne s'était pas opérée. Un second essai a été alors entrepris avec une quantité relative d'acide cinq fois supérieure: 50 μ l de SO_4H_2 pour 30 μ g de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$ adsorbés sur 50 mg de poudre de verre.

Séparation des produits de la réaction

Après hydratation et neutralisation du milieu réactionnel, la solution a été analysée comme précédemment par chromatographie en butanol ammoniacal. L'autoradiochromatogramme (Fig. 14,A, moitié gauche) met en évidence deux zones de produits marqués dont l'une est constituée par TA_3 n'ayant pas réagi ($R_f = 0,75$) et l'autre - peu radioactive - de R_f voisin de celui des iodures ($R_f = 0,30$) (Fig. 14,A,1). Cette dernière est éluee par NH_4OH à 1 % : éluat 1.

De manière à dissocier éventuellement dans cet éluat les iodures de, ou des produits organiques marqués, on l'a soumis à une électrophorèse préparative en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M de $\text{pH} = 9$, sous 500 Volts, 30 mA pendant cinq heures. Dans ces conditions les iodures migrent à plus de 15 cm de l'origine; or, sur l'autoradioionophorègramme (Fig. 14,B,2) une seule bande radioactive est visible à 5 cm de l'origine en direction de l'anode. Le premier éluat renferme donc un dérivé de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$. Il est élué comme précédemment et de manière à vérifier l'existence d'un seul produit marqué dans ce deuxième éluat et d'en préciser les caractéristiques chromatographiques, la presque totalité est analysée préparativement en phase descendante en n-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) (Fig. 14,C), tandis qu'une partie aliquote est soumise à une chromatographie en phase ascendante en collidine-eau (100:35) en atmosphère NH_3 (Fig. 14,D). La zone 3 du chromatogramme préparatif en butanol acide est éluee par NH_4OH à 1 % et cet éluat 3 servira à l'identification du produit.

Identification et caractérisation de $\text{STA}_3(3'-^{131}\text{I})$

Diverses possibilités devaient être envisagées concernant la nature du dérivé de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$ obtenu par action de SO_4H_2 à froid, et isolé à l'état pur dans le troisième éluat. Il pouvait s'agir soit d'un produit de déshalogénation, soit d'un dérivé de sulfonation ou encore

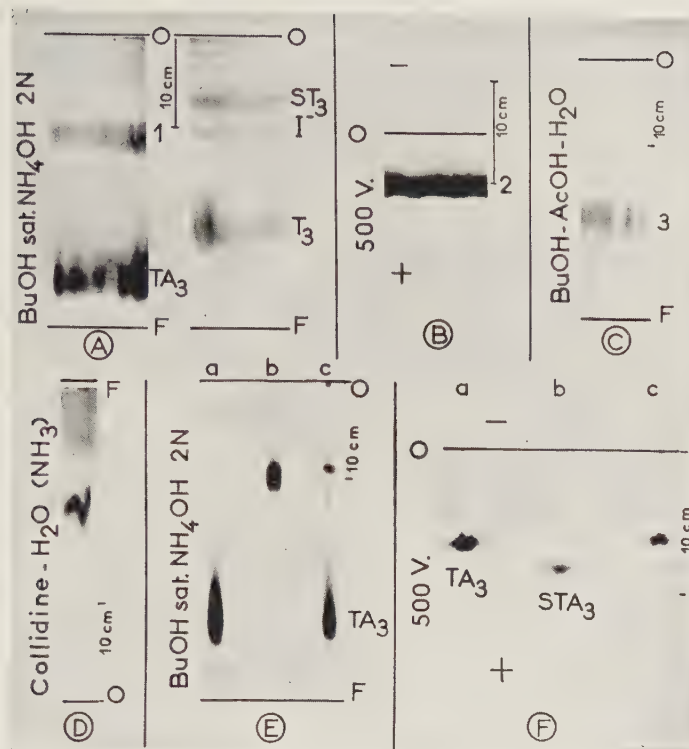


FIGURE 14.

Autoradiogrammes relatifs à la synthèse de STA_3 ($3'.^{131}I$) :

- A. (Moitié gauche.) Analyse chromatographique préparative descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N, des produits de la réaction de SO_4H_2 sur TA_3 ($3'.^{131}I$) ; (Moitié droite.) document comparatif obtenu avec les produits de la réaction de SO_4H_2 sur T_3 ($3'.^{131}I$).
- B. Electrophorèse en tampon $CO_3(NH_4)_2$, 0,05 M, pH = 9, sous 500 V, 25 mA, pendant cinq heures, de l'éluat 1 de A.
- C. Chromatographie préparative descendante en n - butanol - acide acétique - eau (78 : 5 : 17) de l'éluat 2 de B.
- D. Eluat 3 de C analysé par chromatographie ascendante en collidine-eau (100 : 35) en atmosphère NH_3 .
- E. Eluat 3 de C analysé par chromatographie descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N avant (b) et après hydrolyse acide ménagée (c) avec TA_3 ($3'.^{131}I$) en parallèle (a).
- F. Produit de l'éluat 3 de C analysé par électrophorèse en $CO_3(NH_4)_2$, 0,05 M, pH = 9, sous 500 V, 25 mA, pendant 5 heures, (b) avant et (c) après hydrolyse acide ménagée avec TA_3 ($3'.^{131}I$) en parallèle (a).

de l'ester sulfurique $\text{STA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$. Dans cette dernière éventualité seule, l'hydrolyse acide ménagée devait régénérer l'acide triiodothyroacétique, alors qu'il n'en serait pas de même s'il s'agissait d'un dérivé sulfonique. En effet, par action de HCl 6 N sur l'ester sulfurique de la tyrosine, la fonction phénolique est régénérée, mais dans le cas du dérivé sulfonique, cette même fonction partiellement bloquée, n'est pas libérée par un tel traitement (136). La formation du dérivé sulfonique était d'ailleurs peu vraisemblable attendu qu'il n'apparaît pas dans la préparation de ST_3 et que dans celle de l'ester sulfurique de la tyrosine son taux est extrêmement faible (119, 136, 197).

Si on envisageait la formation possible d'un dérivé par désioduration de $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ deux possibilités étaient à retenir : il pouvait s'agir soit de $\text{TA}_2(3'\text{-}^{131}\text{I})$ soit de $\text{TA}_1(3'\text{-}^{131}\text{I})$, or l'un et l'autre, en butanol ammoniacal ont un R_f très différent (0,65 et 0,53) de celui (0,36) du produit de notre réaction.

Une partie aliquote de l'éluat 3 a été évaporée jusqu'à siccité sous pression réduite en présence de P_2O_5 . Le résidu a été repris par HCl 1 N et maintenu au bain-marie à l'ébullition pendant dix minutes. Après évaporation, le nouveau résidu est dissous dans 100 μl de NH_4OH concentré. Cette solution est analysée d'une part par chromatographie en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (Fig. 14,E,c) et d'autre part par électrophorèse en tampon $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M de pH = 9, sous 500 Volts, 25 mA, pendant cinq heures (Fig. 14,F,c). Les autoradiographies de ces documents réalisées avec $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ et le produit initial de l'éluat 3 comme corps de référence, montrent que ce dernier régénère $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ après hydrolyse acide et est donc bien son ester sulfurique. STA_3 a été caractérisé par rapport à TA_3 et I^- en chromatographie dans les trois solvants précités et en électrophorèse à pH = 9 sous 500 Volts : les résultats de ces analyses sont rassemblés dans le tableau 5. Comme dans le cas de ST_3 , l'ester sulfurique a un R_f inférieur à son précurseur dans les solvants butanoliques et en collidine. Par ailleurs les premiers le séparent bien des dérivés connus de TA_3 à savoir le glycuconjugué (GTA_3) (176) et les acides 3-mono- et 3,3'-diiodothyroacétiques (182). En électrophorèse dans les conditions adoptées enfin, il se dissocie nettement de TA_3 dont la migration est plus faible.

Rendement

Comme nous l'avons signalé, l'estérification de TA_3 s'effectue plus difficilement que celle de l'hormone triiodée correspondante. En effet, avec 300 μg de ce dernier produit et 100 μl de SO_4H_2 , la réaction a lieu avec un rendement satisfaisant de 25 à 60 % mais tel n'est pas le cas avec TA_3 qui nécessite une quantité d'acide cinq fois plus grande pour un rendement maximum de dix pour cent. Cette différence résulte sans doute d'une mise en suspension plus facile et plus fine de T_3 dans le milieu réactionnel et de sa plus grande solubilité dans SO_4H_2 concentré.

Tableau 5

R_f à 18°C

Solvants (207)	Produits analysés	STA ₃	TA ₃	I ⁻
n-butanol saturé par NH ₄ OH 2 N , en (phase descendante)		0,36	0,75	0,30
n-butanol acide acétique H ₂ O (78:5:17) , en (phase descendante)		0,62	0,97	0,20
Collidine - H ₂ O (100:35) atmosphère NH ₃ , en (phase ascendante)		0,65	0,80	0,80
Electrophorèse sur papier Whatman n° 1		Migration vers l'anode en cm :		
CO ₃ (NH ₄) ₂ 0,05 M , PH = 9 , 500 Volts, 25 mA, 5 heures		8 - 9	6 - 7	15

Résumé

Nous avons préparé l'ester sulfurique de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique marqué en 3' par ¹³¹I , STA₃(3'-¹³¹I) , par action directe à froid de SO₄H₂ concentré. Ce produit n'avait pas encore été préparé. Nous l'avons séparé et purifié par électrophorèse et chromatographie successives. Son identification repose sur le fait qu'il est chromatographiquement et ionophorétiquement distinct de TA₃ , qu'il régénère par hydrolyse acide ménagée.

Il a été analysé comparativement à TA₃ , par chromatographie dans trois solvants et par électrophorèse en CO₃(NH₄)₂ 0,05 M à pH = 9 sous 500 Volts pendant 5 heures.

STA₃ dans les solvants butanoliques possède un R_f inférieur à celui de TA₃ et sa migration électrophorétique dans les conditions précitées est supérieure à celle de ce dernier.

Ces caractéristiques ont été mises à profit dans nos recherches pour d'identification de STA₃ en tant que métabolite de TA₃ dans les humeurs.

CHAPITRE II

Identification de STA_3 dans la bile du Rat thyroïdectomisé traité par TA_3

Introduction

TA_3 , métabolite de T_3 possède une structure analogue à celle de l'hormone son précurseur, puisque seule la chaîne latérale diffère. Ainsi que T_3 , il subit une déshalogénéation rapide (41) et son hydroxyle phénolique se conjugue à l'acide glycuronique (176).

On pouvait donc envisager que cette similitude concernait également la sulfoconjugaison, hypothèse d'autant plus vraisemblable que l'on avait signalé dans la bile du Rat traité par TA_3 , un produit du métabolisme de celui-ci qui n'était pas identifié, de $R_f = 0,33$ en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N, et occupant après chromatographie en collidine-eau (100,15) en atmosphère NH_3 , une position comprise entre $R_f = 0,60$ et $R_f = 0,80$ (176). Ses caractéristiques concordaient donc avec celles de l'ester sulfurique de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (STA_3) préparé par nous.

En possession du corps de référence et ayant précisé certaines de ses propriétés, nous avons élaboré une méthode analytique nous permettant d'établir l'identité éventuelle de ce métabolite avec STA_3 .

Mode opératoire

Nos expériences ont comporté l'administration de $TA_3(3'-^{131}I)$ à dose physiologique ou pharmacologique et simultanément à lui, celle de $^{35}SO_4Na_2$ dans l'intention d'obtenir un sulfoconjugué du dérivé hormonal marqué par les deux radioisotopes. Les corps de référence utilisés pour l'analyse des produits biliaires ont été TA_3 et $STA_3(3'-^{131}I)$ préparés l'un et l'autre suivant la technique précédemment décrite.

$TA_3(3'-^{131}I)$ possédait une radioactivité spécifique de 200 $\mu C/\mu g$ et a été injecté par voie intramusculaire à raison de 0,1 μg par animal en solution dans 0,5 ml à $pH = 9$; $^{35}SO_4Na_2$ sans entraîneur (Centre d'Amersham, Angleterre) a été administré de même, à la dose de 100 μC . Les mesures de radioactivité et les autoradiographies ont été réalisées comme décrit dans la première partie de ce mémoire. L'étude des produits biliaires a été conduite suivant une technique analytique comportant ainsi que celle des expériences précédentes relatives au métabolisme de T_3 , électrophorèse et chromatographies préparatives successives. L'électrophorèse à $pH = 9$ sous 500 Volts pour l'élimination des sels minéraux et d'une partie des pigments est suivie de l'élution des produits organiques marqués qui sont ensuite analysés par chromatographie en n-buta-

nol saturé par NH_4OH 2 N . Les produits au R_f de STA_3 élués du chromatogramme, sont alors analysés en n-butanol-acide acétique-eau.

Nous avons vu, dans la première partie de notre travail (Ch. II, Expérience I) que les produits marqués par ^{35}S dans la bile des animaux thyroïdoprives traités uniquement par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, possédaient en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N un R_f inférieur à 0,50 et en butanol-acide acétique-eau un R_f inférieur à 0,30. Or, dans ce dernier solvant le R_f de STA_3 est de 0,62. Il n'était dès lors pas nécessaire, pour la recherche de ce sulfoconjugué, de procéder à une purification chromatographique supplémentaire dans un troisième solvant (voir discussion Ch. II, 1ère Partie).

Expérience biologique et analyse des produits biliaires

Six rats mâles de 250 g thyroïdectomisés depuis trois semaines et maintenus à 24°C , ont reçu $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et une heure après, $0,1\text{ }\mu\text{g}$ de $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ (groupe I). Six autres animaux ont été traités par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et par 10 mg de TA_3 marqué (groupe II). La bile a été recueillie dans les six heures suivantes par un tube de polythène à demeure dans le canal cholédoque.

Groupe I. Des électrophorèses ont été opérées sur 1 ml de bile déposée sur une longueur de 15 cm de papier Whatman n° 3 MM et soumise à 480 Volts, 30 mA durant cinq heures en tampon $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M de pH = 9 . Les autoradiogrammes de celles-ci ont permis d'individualiser en dehors d'iodures et de sulfates, qui migrent alors à plus de 15 cm, 2 bandes de constituants radioactifs, accompagnés de pigments à 5 et 8 cm de l'origine en direction de l'anode. Les uns sont principalement iodés et les autres renferment ^{131}I et ^{35}S (Fig. 15,A,1 et 2). Les bandes 1 et 2 ont été éluées séparément par du n-butanol saturé d'eau pendant 24 heures. Les produits de ces éluations (éluat 1 et 2) ont été analysés par chromatographie descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (Fig. 15,B). L'autoradiochromatogramme de l'éluat 1 (Fig. 15,B,a) permet de constater la présence de plusieurs dérivés iodés dont le glycuroconjugué de TA_3 antérieurement identifié ($R_f = 0,10$) et un produit inconnu au R_f de STA_3 . Le premier élué, son identification a été vérifiée (176) en n-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) et en collidine-eau (100:35) en atmosphère de NH_3 , $R_f = 0,70$ et $R_f = 0,28$ respectivement. L'autoradiochromatographie de l'éluat 2 analysé de même (Fig. 15,B,b) sépare plusieurs fractions radioactives dont les plus abondantes, ayant un R_f voisin de celui de STA_3 , renferment ^{131}I et ^{35}S ($R_f = 0,30$ à $0,40$). Cette zone est éluée par du n-butanol saturé d'eau à pH = 10 par addition de NH_4OH , éluat 3, qui est rechromatographié préparativement en n-butanol-acide acétique-eau. Cette opération sépare deux produits dont l'un au voisinage de l'origine ne renferme que ^{35}S et l'autre est marqué par l'iode et le soufre radioactifs ($R_f = 0,65$) ainsi que l'illustre le radiochromatogramme de la figure 16,A. A la lecture de ce document on remarque l'étalement de la tache de ce dernier, et dans celle-ci la faible part de radioactivité qui re-

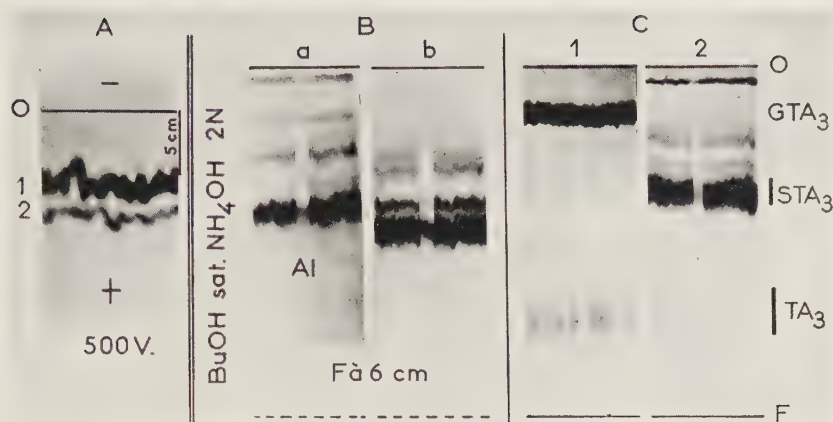


FIGURE 15.

Autoradiographies relatives aux produits radioactifs biliaires après administration de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et de $0.1 \mu\text{g}$ (B) ou 10 mg (C) de TA_3 ($3',^{131}\text{I}$) :

- A. Electrophorèse préparative de la bile, effectuée sur papier Whatman n° 3 MM en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$, 0.05 M , $\text{pH} = 9$, sous 500 V , 35 mA , pendant cinq heures. Ce document a été obtenu avec la bile d'animaux ayant reçu 10 mg TA_3 : les documents concernant ceux injectés de $0.1 \mu\text{g}$ TA_3 sont qualitativement semblables.
- B. Eluats des bandes 1 (a) et 2 (b) de l'électrophorèse de la bile après traitement par $0.1 \mu\text{g}$ TA_3 ($3',^{131}\text{I}$) et analysés en chromatographie préparative descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N .
- C. Eluats 1 (C, 1) et 2 (C, 2) de l'électrophorèse de la bile après injection de 10 mg TA_3 ($3',^{131}\text{I}$) et chromatographiés comme B.

Al : filtre d'aluminium (20 mg/cm^2) interposé entre le chromatogramme et le film dans les quatre documents.

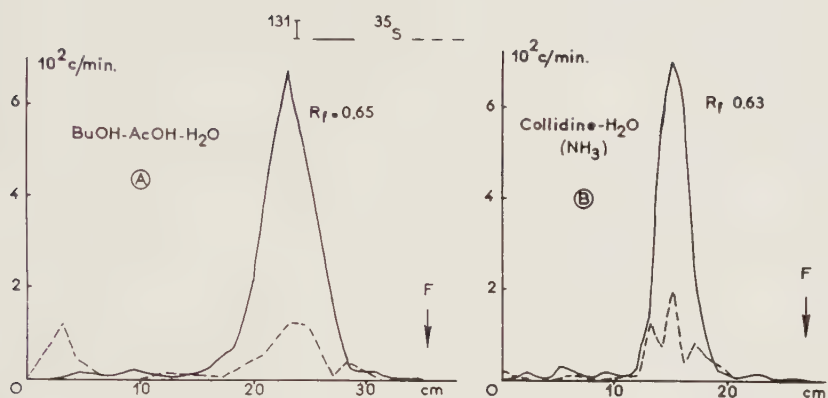


FIGURE 16.

Radiochromatogrammes différentiels de ^{131}I et ^{35}S des produits biliaries après traitement par $0,1 \mu\text{g TA } (3^7\text{-}^{131}\text{I})$ et $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$.

- A. Eluat de la bande au R_f de STA_3 dans le chromatogramme préparatif (fig. 15, B, b), analysé par chromatographie descendante en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17).
- B. Eluat de la bande au $R_f = 0,65$ de A, chromatographié en phase ascendante en collidine-eau (100 : 35) en atmosphère NH_3 .

vient à ^{35}S . Une partie de l'éluat 4 de cette bande a été soumise à une chromatographie ascendante en collidine-eau (NH_3) dans laquelle le composé pur ainsi isolé a le même R_f que STA_3 . Il est essentiellement iodé et ne renferme que des traces de ^{35}S . Le reste de l'éluat 4 a été traité par HCl 0,1 N à l'ébullition pendant quinze minutes et après évaporation du solvant le résidu repris par NH_4OH concentré, a été chromatographié en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. Le radiochromatogramme correspondant met en évidence dans les produits de cette opération une tache contenant ^{131}I au R_f de TA_3 et une autre à l'origine qui contient ^{35}S mais en trop faible quantité pour permettre son identification certaine avec $^{35}\text{SO}_4$.

Discussion. La bile des rats traités simultanément par une dose physiologique (0,04 $\mu\text{g}/100$ g de poids) de $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ et par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ renferme en dehors des iodures et des sulfates éliminés par électrophorèse préparative, deux métabolites iodés principaux dont l'un est le produit de conjugaison de TA_3 avec l'acide glycuronique. L'autre marqué par ^{131}I et paraissant contenir des traces de ^{35}S , possède dans 3 solvants les mêmes R_f que l'ester sulfurique de TA_3 obtenu par synthèse à savoir : 0,35 en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N ; 0,65 en n-butanol-acide acétique-eau et 0,65 en collidine-eau en atmosphère de NH_3 . Ce composé traité par HCl à chaud régénère $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$. L'identification de ce métabolite à STA_3 paraissait donc très vraisemblable mais une caractérisation complémentaire était indispensable. Dans ce but, les animaux du second groupe ont reçu $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et une dose pharmacologique (10 mg) de $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$. Dans ce cas, on devait s'attendre (voir discussion première partie, chapitre I) à isoler de la bile un sulfoconjugué marqué à la fois par les deux radioéléments mais cette fois avec une teneur en ^{35}S permettant une caractérisation aisée de $^{35}\text{SO}_4$, second fragment de la molécule dissociée par l'hydrolyse acide.

Groupe II. La bile est recueillie chez ces animaux et analysée préparativement de la même manière que celle du groupe précédent. Les résultats de cette étude sont illustrés par les autoradiochromatogrammes de la Fig. 15,A et C (explication dans la légende correspondante). Les éluats 1 et 2 de l'électrophorèse préparative chromatographiés en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (Fig. 15,C,1 et 2) séparent les mêmes constituants iodés que dans l'expérience antérieure après injection d'une dose physiologique de TA_3 principalement : GTA_3 , dans l'éluat 1, et un composé inconnu de $R_f = 0,35$ (Fig. 15,C,2) dans l'éluat 2. Ce dernier est élué et chromatographié préparativement en n-butanol-acide acétique-eau. Le radiochromatogramme des produits soufrés et iodés (comparable à celui correspondant à l'expérience I) montre une bande radioactive étalée entre $R_f = 0,55$ et $R_f = 0,80$ renfermant ^{35}S et ^{131}I dans des proportions variables (Fig. 17,A). Cette zone semble donc renfermer plusieurs constituants marqués par ^{35}S . Elle est découpée centimètre par centimètre et chaque bandelette éluée par du n-butanol saturé d'eau. Le rapport ^{35}S en c./min./ ^{131}I en c/min. est établi pour chacun des éluats et ceux dans lesquels la proportion des deux radioéléments est semblable $^{35}\text{S}/^{131}\text{I} \neq 0,9$, sont réunis. Il constituent l'éluat 4 (partie hachurée de la Fig. 17,A) qui, analysé en collidine-

eau s'avère renfermer un composé marqué par ^{131}I et ^{35}S ayant le même R_f que STA_3 . On en vérifie la pureté par chromatographie bidimensionnelle en n-butanol ammoniacal (1ère dimension), n-butanol acétique (seconde dimension), suivie d'une autoradiographie. Celle-ci présente une tache unique (Fig. 18,A), de coordonnées identiques à celle de STA_3 de synthèse et sur la surface de laquelle les proportions relatives des deux radioéléments sont pratiquement constantes.

Nous avons cherché à caractériser également le produit pur ainsi isolé en réalisant son hydrolyse acide partielle par ClH 0,1 N à l'ébullition pendant quinze minutes. Le résidu de cette opération est analysé par chromatographie en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. Le radiochromatogramme de ^{35}S et ^{131}I correspondant révèle la présence de trois taches radioactives : l'une de ^{35}S à l'origine correspondant à $^{35}\text{SO}_4^-$, l'autre (^{131}I) au $R_f = 0,70$ de TA_3 et une troisième occupant une position intermédiaire ($^{35}\text{S} + ^{131}\text{I}$). Afin d'obtenir un complément d'identification, pour ces trois composés, ils ont été soumis à une électrophorèse à $\text{pH} = 9$ dans une seconde dimension perpendiculaire à la première. Dans ce but le chromatogramme a été divisé en deux parties dont l'une (première moitié) est mise en électrophorèse sous 200 Volts pendant deux heures en tampon $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,2 M et l'autre, (seconde moitié) sous 500 Volts, 30 mA pendant cinq heures en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M. L'examen de ces deux autoradiochromatoelectrophorégrammes (Fig. 18,B) a permis l'identification de $^{35}\text{SO}_4^-$ (à l'origine), de $\text{TA}_3(^{131}\text{I})$ au $R_f = 0,70$ et d'une tache intermédiaire. Celle-ci contient ^{35}S et ^{131}I ; son R_f ne correspond cependant pas à celui de STA_3 de référence mais leur migration électrophorétique est la même : il s'agit sans doute d'un produit de la désioduration partielle du métabolite isolé dans l'éluat 4.

Discussion. Dans cette étude, l'analyse des produits biliaires d'animaux traités par 10 mg de $\text{TA}_3(^{131}\text{I})$ et $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, a montré l'existence des mêmes métabolites qu'après traitement par une dose physiologique (0,1 μg) du dérivé acétique. Du point de vue quantitatif, par contre, on remarque que la proportion de $\text{GTA}_3(^{131}\text{I})$ est directement fonction de la quantité de TA_3 administrée. Ces faits sont illustrés par la Fig. 15,B et C. Chez les animaux qui ont reçu 10 mg de TA_3 comme chez les autres, un métabolite quantitativement important a été isolé de la bile à l'état pur ainsi que le vérifie une chromatographie bidimensionnelle (Fig. 18,A). Ce produit possède dans trois solvants les mêmes R_f que STA_3 de synthèse et se déplace comme lui en électrophorèse (Tableau 6). Ce métabolite était marqué simultanément par ^{35}S et ^{131}I , mais cette fois dans un rapport voisin de l'unité ainsi qu'il fallait s'y attendre, s'il s'agissait effectivement de l'ester sulfurique de $\text{TA}_3(^{131}\text{I})$. En effet, dans la première expérience ce rapport était extrêmement faible, mais dans la seconde, la quantité importante de TA_3 entraîneur administrée, devait compenser l'activité spécifique faible de $^{35}\text{SO}_4^-$ dans l'organisme (90, 193). Après hydrolyse acide ménagée, le produit biologique isolé régénère $^{35}\text{SO}_4^-$ et $\text{TA}_3(^{131}\text{I})$: il s'agit donc bien de $\text{STA}_3(^{131}\text{I})(^{35}\text{SO}_3\text{H})$.

Ces deux expériences complémentaires nous autorisent à considérer STA_3 , comme un produit du métabolisme normal du dérivé acétique de T_3 .

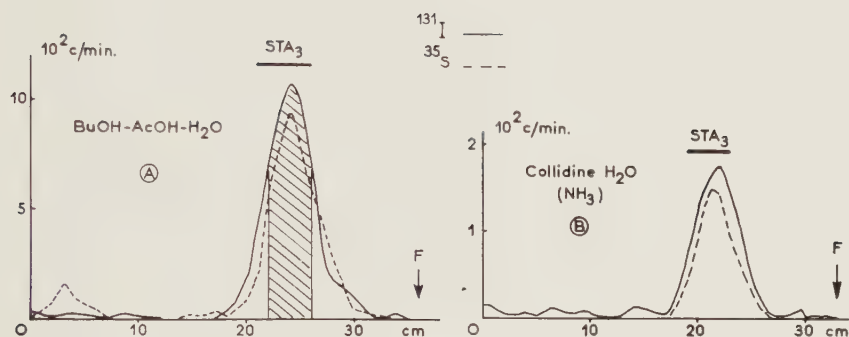


FIGURE 17.

Radiochromatogrammes différentiels de ^{131}I et ^{35}S des produits biliaires après traitement par 10 mg TA_3 ($3' \cdot ^{131}\text{I}$) et $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$. Eluat de la bande au R_f de STA_3 dans le chromatogramme préparatif (fig. 15, C, 2), analysé par chromatographie descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (A) puis, élué de celui-ci (zone hachurée) et chromatographié en phase ascendante en collidine-eau (100 : 35) en atmosphère NH_3 (B).

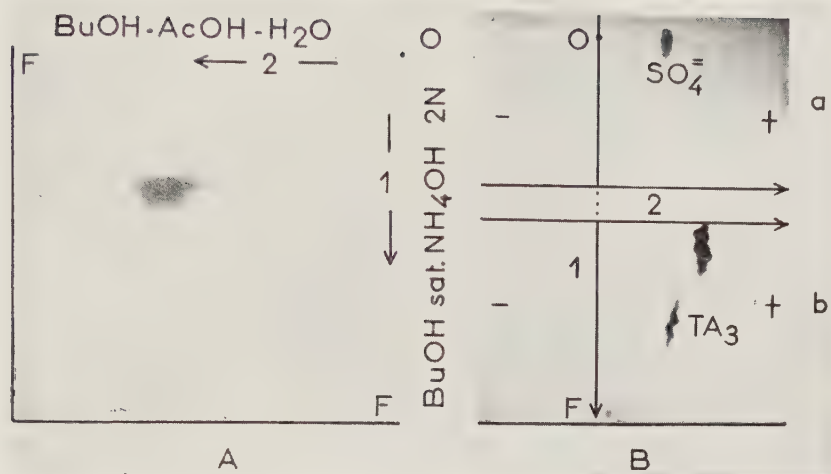


FIGURE 18.

Produit obtenu de la bile des rats injectés de 10 mg TA₃ (3'-¹³¹I) et ³⁵SO₄Na₂ : il a été élué du second chromatogramme préparatif (fig. 17, A, zone hachurée) et est analysé (A) par chromatographie bidimensionnelle en n-butanol saturé par NH₄OH 2 N (première dimension) et en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17) (seconde dimension). (B) Le même produit après hydrolyse acide ménagée, analysé par chromatographie électrophorèse : première dimension (1) chromatographie descendante en n-butanol saturé par NH₄OH 2 N; seconde dimension (2) : électrophorèse en CO₃ (NH₄)₂, 0,2 M, pH = 9 sous 200 V, 20 mA, deux heures de la moitié supérieure (a) et électrophorèse en CO₃ (NH₄)₂, 0,05 M, pH = 9 sous 500 V, 30 mA, cinq heures de la moitié inférieure (b).

Résumé

Chez le Rat thyroïdectomisé préalablement injecté de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et traité ensuite par des doses physiologiques ou pharmacologiques de $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$, nous avons isolé de la bile et identifié l'ester sulfurique de celui-ci marqué simultanément par ^{35}S et ^{131}I : $\text{STA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})(^{35}\text{SO}_3\text{H-})$. L'identification de ce nouveau métabolite a été établie par la concordance de ses R_f dans trois solvants avec ceux de STA_3 obtenu par synthèse, par la similitude de leurs migrations électrophorétiques et par l'analyse des produits de son hydrolyse laquelle régénère $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ et $^{35}\text{SO}_4^{2-}$. Le rapport $^{35}\text{S}/^{131}\text{I}$ extrêmement faible après administration d'une dose physiologique de $\text{TA}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ devient voisin de l'unité si on supplémente l'injection de 10 mg d'entraîneur.

La sulfoconjugaison est un processus du métabolisme normal de TA_3 de même que son précurseur biologique T_3 .

Tableau 6

R_f à 18°C

Solvants Chromatographiques	Produits analysés	TA_3	(1) GTA_3	(2) STA_3	Eluat 4, expérience :	
					I	II
n-BuOH saturé par NH_4OH 2 N (descendant)		0,70	0,15	0,35	0,32	0,35
n-BuOH-AcOH- H_2O (78:5:17) (descendant)		0,95	0,62	0,61	0,62	0,61
Collidine - H_2O (100:35) atm. NH_3 (ascendant)		0,80	0,30	0,65	0,63	0,66
		Migration vers l'anode en cm :				
Electrophorèse sur papier Whatman n°1		TA_3		STA_3	Eluat 4 expérience :	
					I et II	
$\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M , pH = 9 500 V., 30 mA, 5 heures		7		9	9	

(1) d'origine biologique.

(2) de synthèse.

CHAPITRE III

Identification de STA_3 dans le plasma du Rat thyroïdectomisé traité par TA_3

Il a été établi que TA_3 de même que son précurseur biologique T_3 , était rapidement métabolisé (41, 173, 176) et en partie éliminé par la bile sous la forme d'un conjugué avec l'acide glycuronique (176). Par ailleurs nous venons de démontrer que la sulfoconjugaison de cette hormone et de son dérivé acétique était un processus normal de leur métabolisme. Or, nous avons aussi montré la présence de ST_3 dans le sang du Rat traité par une dose physiologique de T_3 et cette observation a soulevé le problème du rôle biologique de la conjugaison sulfurique des hormones thyroïdiennes. Il était donc intéressant de préciser si l'ester sulfurique du dérivé acétique de T_3 , STA_3 qui est excrété normalement par la bile, se retrouvait également dans le sang, et ce, d'autant plus que la nature des dérivés sanguins de TA_3 , est encore inconnue (173, 176).

Mode opératoire

Les techniques analytiques utilisées dans ces recherches étant essentiellement les mêmes que celles précédemment décrites, nous ne les rapporterons ici que sommairement.

Le présent travail comprend les résultats complémentaires de trois expériences conduites chez le Rat thyroïdectomisé traité par $^{35}SO_4Na_2$ et par des doses différentes de $TA_3(3' - ^{131}I)$ d'une radioactivité spécifique de 30 $\mu C/1 \mu g$ mis en solution dans 1 ml d'eau à pH = 9 par addition de NaOH.

Expérience I. On réalise une obstruction biliaire par ligature du canal cholédoque (50) chez six rats mâles (100-150 g) thyroïdectomisés depuis un mois et maintenus à 24°C. Les animaux sont ensuite, immédiatement traités par injection musculaire de $^{35}SO_4Na_2$, (160 μC sans entraîneur) précédant d'une heure celle de 1 μg de TA_3 marqué par ^{131}I . Six heures après cette dernière injection, ils sont décapités et le sang est recueilli sur héparine. Le plasma qui en est séparé (15 ml), renfermant respectivement 5 % et 0,5 % de ^{131}I et de ^{35}S injectés est ensuite lyophilisé. La poudre résultant de cette opération est délipidée et soumise, comme décrit précédemment (Première partie Ch. III) à une extraction ammoniacale fractionnée dont les protéines sont éliminées, par précipitation alcoolique. Les extraits réunis sont purifiés par addition d'un égal volume de chloroforme donnant une suspension qui se sépare en une phase inférieure chloroformique qui est éliminée (elle renferme des pigments et un résidu lipido-protéique) et une phase supérieure hydro-alcoolique claire constituant l'extrait final (80 % de

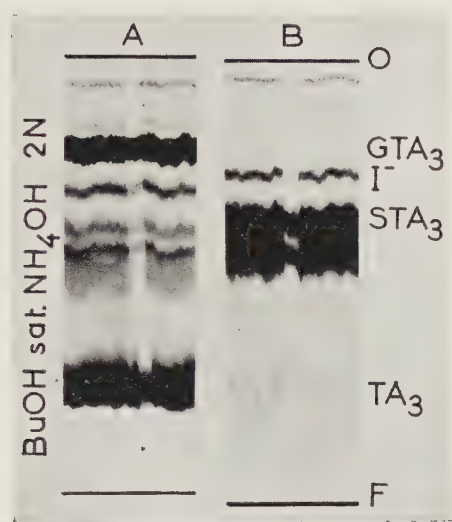


FIGURE 19.

Produits des éluats de l'électrophorèse préparative à laquelle ont été soumis les extraits plasmatiques de rats en obstruction biliaire et traités par $^{53}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et $1\mu\text{g}$ de TA_3 ($3'\text{-}^{131}\text{I}$). Cette électrophorèse sépare deux bandes de produits radioactifs.

Autoradiochromatogrammes de l'éluat de la première bande (A) et de l'éluat de la seconde bande (B), analysés en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.

(Un écran d'Al — 20 mg/cm^2 — sous forme d'une bandelette, placé entre le film et le chromatogramme, permet de constater que les produits organiques séparés contiennent tous au moins ^{131}I).

^{131}I de la poudre plasmatique). Ce dernier est concentré sous azote et pression réduite à une température inférieure à 40°C , puis déposé le long d'une ligne de 25 cm sur papier Whatman n° 3MM en vue d'une électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M de pH = 9, sous 500 Volts, 45 mA pendant cinq heures. Dans ces conditions, on sépare les sels minéraux des composés organiques marqués : les premiers (SO_4^- et I^- en particulier) migrent vers l'anode à plus de 10 cm de l'origine et les seconds à 5 (bande A) et 7 cm (bande B). Les produits des bandes A et B élués séparément par le n-butanol saturé d'eau ammoniacale de pH = 10 (éluat A et B) sont chromatographiés en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. Les autoradiochromatogrammes correspondants (Fig. 19, A et B) montrent plusieurs zones radioactives (^{35}S et ^{131}I) parmi lesquelles les corps iodés sont repérés grâce à l'interposition entre le film et le chromatogramme d'un écran d'aluminium (Al : 20 mg/cm^2).

L'éluat A renferme principalement deux produits marqués par ^{131}I , l'un au R_f de GTA_3 et l'autre à celui de TA_3 . L'éluat du premier a permis son identification à GTA_3 après hydrolyse acide ménagée laquelle régénère TA_3 . Par ailleurs ce métabolite analysé en chromatographie en collidine-eau, possède le même $R_f = 0,30$ que GTA_3 antérieurement caractérisé, par le fait que sous l'effet de la β -glycuronidase, il régénère TA_3 (176).

Le second, élué et chromatographié en butanol acétique a le $R_f = 0,95$ de TA_3 . Dans l'éluat B, on sépare deux composés iodés principaux dont l'un au R_f de STA_3 de référence, renferme ^{131}I et ^{35}S .

En résumé, chez le Rat en obstruction biliaire aiguë, l'administration de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$ est suivie de l'apparition dans le sang des mêmes produits iodés marqués que ceux identifiés dans la bile après traitement semblable, à savoir TA_3 , GTA_3 et un dérivé au R_f de STA_3 (Fig. 15). Le fait qu'ils ont pu être mis en évidence, démontre que l'extraction du plasma a été qualitativement complète et que dès lors la technique adoptée pour celle-ci est applicable à une étude similaire sur du plasma de rats normaux, étude plus délicate en raison du taux nécessairement beaucoup plus faible des produits métaboliques.

Expérience II. Dix rats σ (100-150 g) thyroïdectomisés (non ictériques cette fois) ayant reçu par voie intramusculaire $160 \mu\text{C}$ de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ (sans entraîneur) et une heure plus tard $1 \mu\text{g}$ de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$ sont sacrifiés par saignée à la sixième heure. Le plasma recueilli (18 ml) contient 2 % de ^{131}I et 0,3 % de ^{35}S injectés. L'étude analytique de ces produits marqués est conduite exactement comme celle de l'expérience précédente à partir de l'extrait ammoniacal du plasma lyophilisé et délipidé. On soumet d'abord cet extrait à une électrophorèse préparative [$\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, de pH = 9, 500 Volts, cinq heures] suivie de l'éluution des composés organiques marqués (^{131}I et ^{35}S) : éluat 1 (Fig. 20, A, 1). La chromatographie de ce dernier en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (Fig. 20, B) sépare les mêmes constituants que ceux identifiés dans le sang des animaux en obstruction cholédocienne, mais dans des proportions différentes. La bande la plus radioactive au R_f de STA_3 de référence (Fig. 20, B, 2) contenant les deux radioéléments ainsi que l'attestent les radiochromatogrammes correspondants de ^{35}S et ^{131}I

(Fig. 21,A), est éluée par du butanol saturé d'eau ammoniacale (pH = 10). Cet éluat 2 analysé préparativement en n-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) s'avère constitué par un produit iodé principal au $R_f = 0,63$ de STA₃ de référence (Fig. 20,C,3). Le produit de son élution (éluat 3) est fractionné en trois parties aliquotes destinées à vérifier la pureté du corps isolé, à y rechercher la présence de ³⁵S et à le soumettre à une hydrolyse acide. L'autoradiochromatogramme après analyse bidimensionnelle (1, butanol ammoniacal et 2, butanol acétique) révèle l'existence d'un produit pur (à l'exception d'une faible tache de ¹³¹I⁻) et ses coordonnées sont celles de STA₃ (Fig. 20,D). Il renferme par ailleurs ¹³¹I et des traces de ³⁵S ainsi que le montre le radiochromatogramme différentiel de ³⁵S et ¹³¹I de ce produit analysé en n-butanol saturé par NH₄OH 2 N (Fig. 21,B). Enfin l'analyse des produits de son traitement par ClH 0,1 N à l'ébullition, permet d'identifier TA₃(3'-¹³¹I) ainsi que des traces d'iodure et de produit inchangé, comme l'illustre l'autoradiochromatogramme (E) de la Fig. 20.

En résumé, dans le sang du Rat traité par ³⁵SO₄Na₂ et une dose pratiquement physiologique de TA₃(3'-¹³¹I), les mêmes métabolites iodés que dans l'étude précédente (Rat en ictère obstructif aigu) ont été observés, mais dans des proportions très différentes. Le plus abondant semble-t-il, est un dérivé marqué simultanément par ¹³¹I et ³⁵S mais avec un rapport ³⁵S/¹³¹I extrêmement faible. Il possède les mêmes coordonnées que STA₃ de référence en chromatographie bidimensionnelle et son identification à celui-ci a été complétée par l'analyse des produits de son hydrolyse acide ménagée. Celle-ci a permis d'identifier un des fragments de la molécule dissociée, à savoir TA₃(3'-¹³¹I). L'expérience suivante a été conduite de manière à pouvoir caractériser aisément l'autre, c'est-à-dire ³⁵SO₄⁼.

Expérience III. On injecte 125 µC de ³⁵SO₄Na₂ (sans entraîneur) à cinq rats ♂ thyroïdectomisés de 200-250 g qui sont traités une heure plus tard par une dose pharmacologique de 10 mg de TA₃ non radioactif. Les animaux sont sacrifiés après six heures et les 15 ml de plasma obtenu (1,3 % de ³⁵S administré) sont lyophilisés, délipidés et extraits, comme précédemment décrit. Les produits organiques radioactifs ainsi obtenus sont débarrassés des sels minéraux par électrophorèse préparative et après élution sont analysés en chromatographie en n-butanol ammoniacal. L'autoradiochromatogramme révèle l'existence de plusieurs composés marqués par ³⁵S dont l'un (Fig. 22,A,1) de $R_f = 0,27$, et l'autre (Fig. 22,A,2) de même $R_f = 0,35$ que STA₃. Ils sont tous deux élués par du n-butanol saturé d'eau ammoniacale de pH = 10 et les éluats 1 et 2 correspondants sont réunis, puis chromatographiés préparativement en n-butanol acétique. Sur ce document autoradiographié, une zone étalée de faible radioactivité est visible, correspondant dans sa moitié inférieure au $R_f = 0,60$ de STA₃ (Fig. 22,B,3). L'éluat 3 de cette bande renferme également un produit iodé mis en évidence par une réaction positive avec le réactif au sulfate cérrique - arsénite de Na (Bowden-MacLagan). Une partie aliquote est soumise à une chromatographie électrophorèse (1, butanol saturé par NH₄OH 2 N et 2, électrophorèse en CO₃(NH₄)₂ 0,05 M, pH = 9, 500 Volts, cinq heures) qui est révélée par une autoradiographie (Fig. 22,C) et ensuite par la réaction de

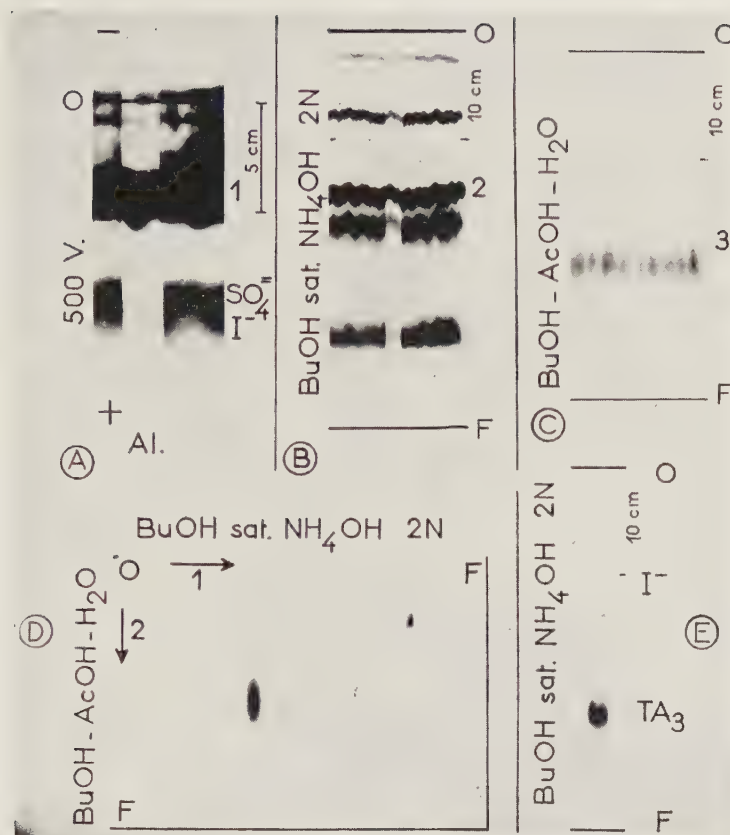


FIGURE 20.

Autoradiogrammes relatifs à l'analyse des extraits du plasma de rats traités par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et $1\text{ }\mu\text{g}$ de TA_3 ($3\text{'-}^{131}\text{I}$) :

- A. Electrophorèse préparative de l'extrait plasmatique réalisée sur papier Whatman n° 3 MM en tampon $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$, 0,05 M, pH = 9, sous 500 V, 35 mA, pendant 5 heures.
- B. Eluat 1 de A analysé par chromatographie préparative descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.
- C. Eluat 2 de B, chromatographié préparativement en phase descendante en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17).
- D. Eluat 3 de C analysé par chromatographie bidimensionnelle descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (première dimension) et en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17) (seconde dimension).
- E. Produits de l'éluat 3 de C après hydrolyse acide ménagée, chromatographiés en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.

Al : écran d'aluminium (20 mg/cm^2) entre le film et le chromatogramme.

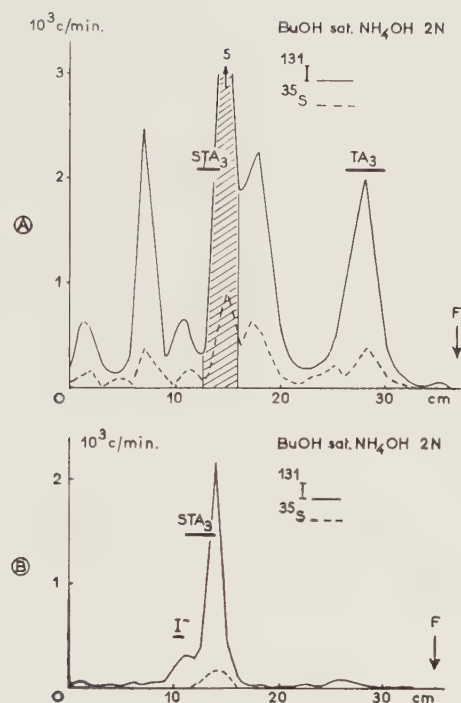


FIGURE 21.

Radiochromatogrammes différentiels de ^{131}I et ^{35}S :

- A. De l'éluat 1 (voir fig. 20, A) de l'électrophorèse préparative effectuée avec les extraits plasmatiques après traitement par $1 \mu\text{g TA}_3$ ($3 \cdot ^{131}\text{I}$) et $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$. L'éluat 1 est analysé préparativement en n-butanol saturé par $\text{NH}_4\text{OH 2 N}$; l'autoradiogramme correspondant est donnée fig. 20, B.
- B. De l'éluat de la zone hachurée en A, chromatographié à nouveau dans le même solvant après purification par chromatographie préparative en n-butanol-acide acétique-eau (fig. 20, C).

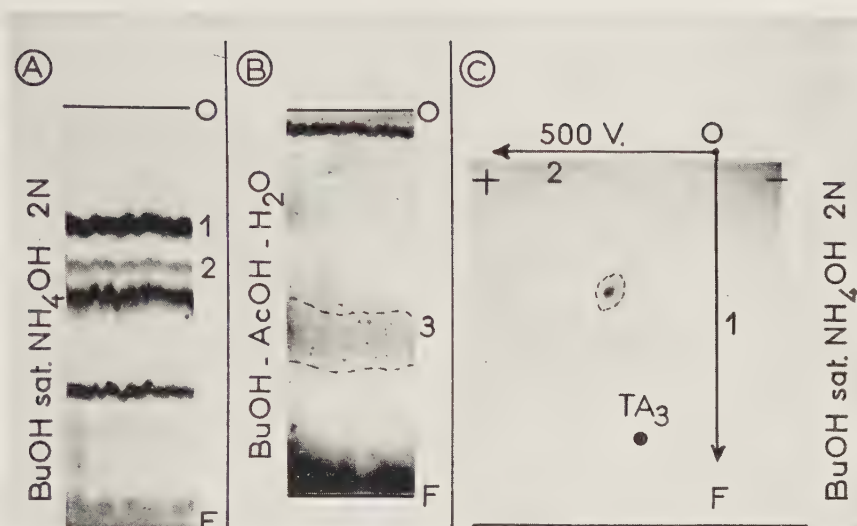


FIGURE 22.

Autoradiogrammes concernant l'analyse des extraits plasmatiques des rats traités par 10 mg TA_3 et $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$:

- A. Eluat de l'électrophorèse préparative, chromatographié préparativement en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.
- B. Eluats 1 + 2 de A, analysés par chromatographie préparative descendante en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17).
- C. Eluat 3 de B, analysé par chromatoelectrophorèse : 1) chromatographie en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N et 2) électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, pH = 9, sous 500 V., 30 mA, pendant cinq heures.

(TA_3 : position de ce corps de référence.)

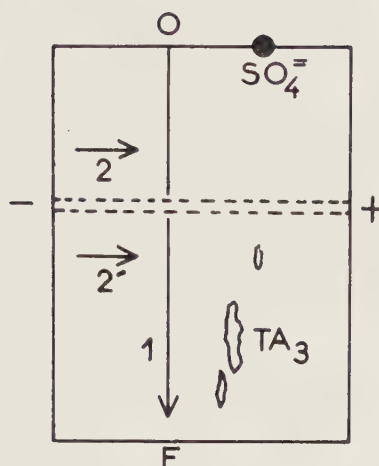


FIGURE 23.

Schéma illustrant la révélation du chromatoelectrophorègramme du produit de l'éluat 3 de B (figure précédente) après hydrolyse acide ménagée.

1. Première dimension : chromatographie descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N.
2. Seconde dimension : électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,2 M, pH = 9, sous 200 V, 20 mA, deux heures (révélation par autoradiographie).
- 2'. Seconde dimension : électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, pH = 9, sous 500 V, 30 mA, cinq heures (révélation par la réaction de Bowden-Mac Lagan).

Bowden-Maclagan. Un seul composé apparaît, marqué par ^{35}S et renfermant ^{127}I dont les coordonnées sont celles de STA_3 de référence.

L'éluat 3 restant est évaporé et traité par $\text{ClH } 0,1 \text{ N}$, 15 minutes à l'ébullition. Le résidu sec de cette opération repris par NH_4OH concentré, est analysé par chromatographie en n-butanol ammoniacal dans une première dimension et électrophorèse dans une seconde, avec TA_3 et SO_4Na_2 comme corps de référence en parallèle. Sur le radiochromatogramme, un seul sommet est visible à l'origine, comme $\text{SO}_4^{=}$ témoin auquel on l'identifie par électrophorèse dans une seconde dimension [$\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,2 M ; pH = 9, 200 Volts, deux heures] et effectuée sur le tiers supérieur du chromatogramme. Les deux tiers inférieurs de ce dernier sont soumis en seconde dimension à une électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, sous 500 Volts pendant cinq heures et le chromatoélectrophorégramme est révélé par la réaction de Bowden-Maclagan. Le produit iodé principal mis en évidence est TA_3 accompagné de traces de deux autres produits iodés non identifiés. Les résultats de cette analyse sont schématisés dans la figure 23.

En résumé, dans le sang du Rat traité par TA_3 non radioactif à dose pharmacologique et $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, on a isolé un métabolite iodé marqué par ^{35}S , possédant les caractéristiques chromatographiques et ionophorétiques de STA_3 obtenu par synthèse. Grâce à la dose importante (10 mg) du dérivé acétique injecté, une quantité suffisante de ce métabolite a pu être isolée, qui a permis d'identifier dans les produits de son hydrolyse $^{35}\text{SO}_4^{=}$ et TA_3 .

Discussion et Conclusions

Chez le Rat éthyroïdé en obstruction cholédocienne aiguë et traité par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ suivi d'une dose de 1 μg de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$, les composés organiques marqués normalement déversés avec la bile dans l'intestin passent en partie dans le sang. Il a été de la sorte facile d'identifier dans celui-ci le produit de la conjugaison phénolique de TA_3 avec l'acide glycuronique (GTA_3) ainsi qu'un dérivé iodé ayant le même R_f que STA_3 . Dans le plasma d'animaux normaux soumis à un traitement semblable, on a séparé de $^{131}\text{I}^-$ et de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$, deux dérivés marqués par le radioiode dont le plus abondant a le même R_f que STA_3 . Son identification avec ce dernier a été confirmée par la concordance des R_f dans deux solvants et par les résultats d'une hydrolyse acide ménagée laquelle régénère $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$. Dans les conditions expérimentales adoptées, le produit biologique - dont la pureté a été vérifiée par chromatographie bidimensionnelle - était marqué simultanément par ^{131}I ^{35}S mais dans un rapport $^{35}\text{S}/^{131}\text{I}$ très bas, résultant de la quantité infime de TA_3 administré et de la radioactivité spécifique très faible de $^{35}\text{SO}_4^{=}$ dans l'organisme. Celle-ci a été compensée dans une étude similaire, par injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ suivie d'une dose pharmacologique (10 mg) de TA_3 non marqué. Chez ces animaux, on a isolé du plasma un dérivé iodé marqué par ^{35}S qui a été identifié à STA_3 dans deux solvants et par chromatoélectrophorèse. Il a été obtenu en quantité suffisante pour une caractérisation des deux fragments $^{35}\text{SO}_4^{=}$

et TA_3 de la molécule dissociée par hydrolyse.

Les résultats complémentaires de ces trois expériences, consignés dans le tabl. 7⁽¹⁾, amènent à conclure que l'ester sulfurique de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique est présent dans le plasma du Rat thyroïdectomisé traité par TA_3 .

Le métabolisme de TA_3 et celui de son précurseur biologique T_3 sont donc absolument semblables et cette similitude constitue un argument supplémentaire en faveur de la conception "hormonale" du premier. La présence dans le sang des esters sulfuriques de l'un et l'autre suggère leur résorption intestinale partielle et pose le problème de leur rôle biologique, d'autant plus qu'ils apparaissent quelque faible que soit la dose du précurseur injecté.

Résumé.

Dans le plasma du Rat traité par $^{35}SO_4Na_2$ et une dose physiologique de $TA_3(3'-^{131}I)$, nous avons identifié l'ester sulfurique de celui-ci. Il constitue le métabolite circulant principal, accompagné du dérivé injecté, de $^{131}I^-$, de $GTA_3(3'-^{131}I)$ et d'un métabolite inconnu. L'identification de STA_3 dans le milieu biologique a été conduite comme précédemment par purifications chromatographiques successives du métabolite dont la concordance des R_f avec STA_3 de synthèse a été vérifiée dans trois solvants. Ce dérivé isolé à l'état pur, possède la même migration électrophorétique que STA_3 de synthèse et après hydrolyse acide ménagée régénère TA_3 . Il était marqué par les deux radioéléments, avec un rapport $^{35}S/^{131}I$ très faible qui a pu être augmenté par injection d'une quantité importante de TA_3 entraîneur. Dans ce cas, après hydrolyse, il régénère $TA_3(3'-^{131}I)$ et $^{35}SO_4^{=}$. Ces observations renforcent les ressemblances déjà signalées entre le comportement de TA_3 et celui de son précurseur hormonal T_3 .

*

*

*

(1) Tableau 7 : voir page 55.

Tableau 7

R_f à 18°C

Solvants	Produits analysés	STA ₃	(1)	(2)	(2)
			Eluat 3 exp. 1	Eluat 3 exp. 2	Eluat 3 exp. 3
n-butanol saturé par NH ₄ OH 2 N		0,36	0,37	0,37	0,36
n-butanol-acide acétique-eau (78:5:17)		0,63	0,63	0,63	0,62
Collidine-eau (100:35) atm. NH ₃		0,65	0,65	-	-
Electr. pH = 9 , 500 V, CO ₃ (NH ₄) ₂ 0,05 M , cinq heures		Migration vers l'anode en cm			
		9	-	-	9
Produits de l'hydrolyse acide		TA ₃	TA ₃	TA ₃	TA ₃ et SO ₄

(1) Rats thyroïdectomisés et en obstruction biliaire aiguë.

(2) Rats thyroïdectomisés par ailleurs normaux.

CHAPITRE IV

Nature des métabolites urinaires chez le Rat thyroïdectomisé traité par TA_3 , et parmi ceux-ci, identification de STA_3

Introduction

La nature des principaux produits urinaires du métabolisme des hormones thyroïdiennes est actuellement connue. On a montré que l'administration de T_4 marquée en $3'$ par ^{131}I , était suivie d'une excrétion radioactive urinaire qui revenait pour 60 à 90 % aux iodures (37, 38, 41, 56, 204). Il sont accompagnés de quantités variables, mais beaucoup plus faibles d'hormone inchangée, du dérivé pyruvique de celle-ci (TK_4) (160) et d'un taux minime de son glycuconjugué (GT_4) (38, 39, 204).

Après administration de T_3 marquée de même, pratiquement toute la radioactivité éliminée par les urines revient aux iodures (38, 39, 40, 41, 56). A côté de ceux-ci, on a pu mettre en évidence des traces de TK_3 et d'autres dérivés non identifiés (160).

Or, le glycuconjugué de ces hormones est déversé en quantité importante avec la bile dans le tube digestif. Ces observations sur la nature des métabolites urinaires, permettaient donc de considérer que le conjugué des iodothyronines n'était pas éliminé par la voie urinaire. Un raisonnement semblable peut également s'appliquer au sulfoconjugué de T_3 identifié par nous dans la bile et le sang.

En ce qui concerne la nature des dérivés urinaires de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA_3), nous sommes peu renseignés, or ayant individualisé dans ses métabolites biliaires et sanguins le sulfoconjugué (STA_3), on pouvait se demander si celui-ci se comportait comme les autres conjugués et n'était excrété par les reins qu'à l'état de traces. Nous nous sommes donc proposé d'étudier la nature des produits urinaires après administration de TA_3 marqué, et d'y rechercher principalement STA_3 .

Mode opératoire

Nos expériences ont été poursuivies sur des rats σ (180-200 g) thyroïdectomisés depuis un mois et maintenus à 24°C. Elles ont comporté trois essais :

I. Injection d'une dose traceuse de $^{35}SO_4Na_2$ (100 μC) suivie ou non à une heure d'intervalle, de celle de 10 mg de TA_3 non marqué (quatre rats) ;

II. Injection de 0,45 μg ou de 10 mg de $TA_3(3'-^{131}I)$ d'une activité spécifique de 45 $\mu C/\mu g$ (six rats) ;

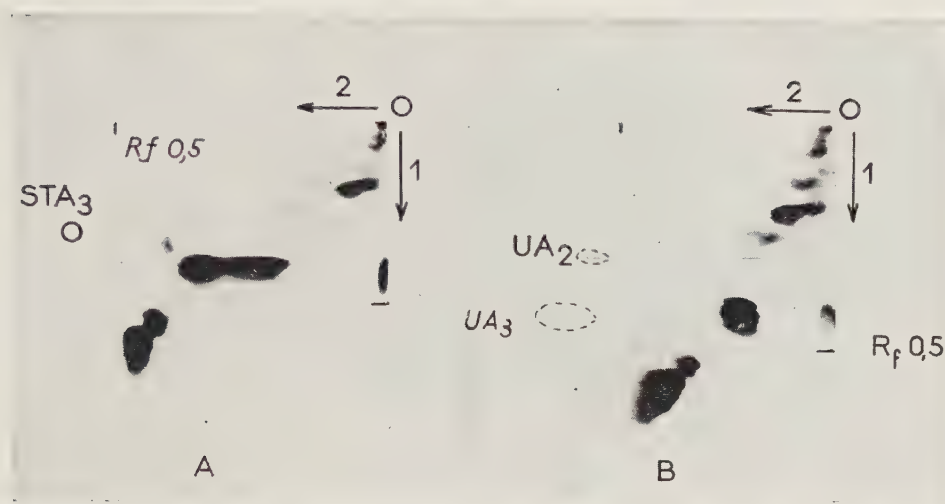


FIGURE 24.

Autoradiochromatogrammes des produits organiques élués de l'électrophorèse préparative des urines : A) d'animaux traités par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et, B) de ceux ayant reçu $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et 10 mg TA_3 (non radioactif). Dans ce dernier cas, deux produits radioactifs supplémentaires de faible importance sont visibles UA_2 et UA_3 . Ces éluats ont été étudiés en chromatographie bidimensionnelle (phases descendantes) 1) n-butanol saturé par NH_4OH 2 N et 2) n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17).

(STA_3 : corps de référence.)

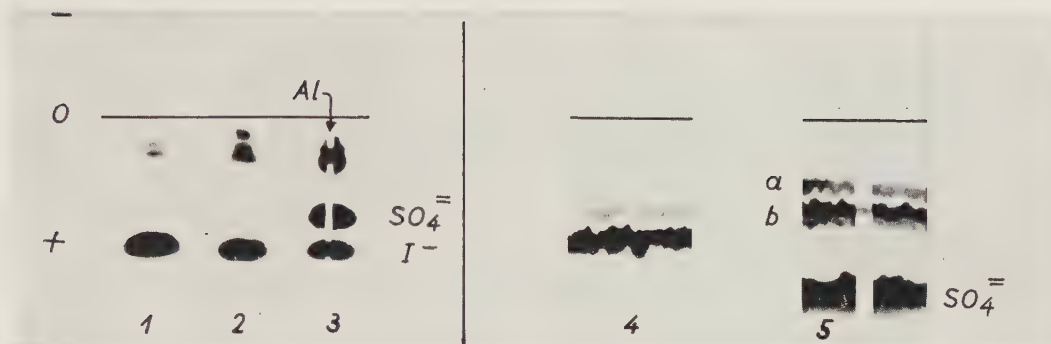


FIGURE 25

Autoradioélectrophorègrammes des urines :

- 1) Après injection de $0,45 \mu\text{g TA}_3 (3'.^{131}\text{I})$.
- 2) Après administration de $10 \text{ mg TA}_3 (3'.^{131}\text{I})$.
- 3) Après injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et $10 \text{ mg TA}_3 (3'.^{131}\text{I})$. Ces analyses ont été effectuées sur papier Whatman n° 1 en $\text{CO}_3 (\text{NH}_4)_2$, $0,2 \text{ M}$, $\text{pH} = 9$, 200 V , deux heures.
- 4) et 5) Autoradiographies après analyse préparative sur Whatman n° 3 MM en $\text{CO}_3 (\text{NH}_4)_2$, $0,05 \text{ M}$, $\text{pH} = 9$, 500 V , cinq heures, des urines :
 - 4) après traitement par $0,45 \mu\text{g TA}_3 (3'.^{131}\text{I})$;
 - 5) après administration de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et $10 \text{ mg TA}_3 (3'.^{131}\text{I})$.

Al : Ecran d'aluminium (20 mg/cm^2) entre le film et le document.

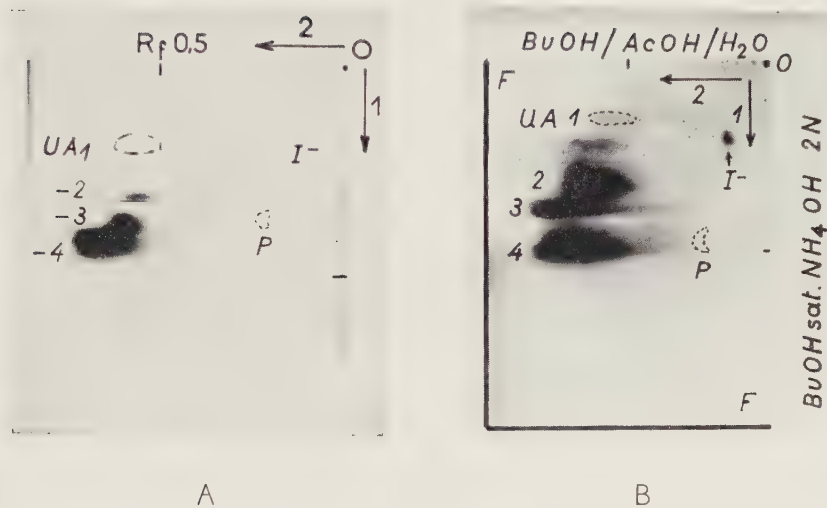


FIGURE 26.

Autoradiochromatogrammes des produits organiques élués de l'électrophorèse préparative des urines après injection A) de 0,45 μg TA_3 ($3',^{131}I$) et B) de 10 mg TA_3 ($3',^{131}I$).

L'analyse est faite par chromatographie bidimensionnelle 1) en n-butanol saturé par $NH_4OH\ 2N$ et 2) en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17).

P : Tache de pigments.

III. Injection de 100 μC de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et de 10 mg de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$ d'une radioactivité de 20 μC (douze rats).

Après traitement, les animaux sont maintenus dans des cages à métabolisme conçues pour la récolte séparée des fèces et des urines, lesquelles sont prélevées de manière fractionnée pendant les quinze premières heures. Les échantillons souillés de matières fécales sont éliminés, et les autres réunis puis déposés en totalité sur papier Whatman n° 3MM le long d'une ligne de 25 cm à raison de 0,2 à 0,3 ml/cm sur des feuilles de 30 x 40 cm destinées à des électrophorèses préparatives en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, pH = 9, pendant cinq heures sous 500 Volts et 40 mA. Les éluats par le n-butanol saturé d'eau ammoniacale à pH = 10 des produits organiques marqués, représentant au total des volumes importants, sont concentrés sous pression réduite en atmosphère d'azote et à température inférieure à 40°C. Leur analyse chromatographique a été conduite avec TA_3 et STA_3 comme corps de référence, suivant un mode opératoire semblable à celui qui a été détaillé dans les chapitres précédents, ce qui nous permettra de le décrire ici rapidement.

Expérience I. Après injection musculaire de 100 μC $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, associés ou non à 10 mg de TA_3 non radioactif, l'urine renferme 50 à 80 % de ^{35}S administré, dont plus de trois quarts à l'état de sulfates. Après l'élimination de ces derniers par électrophorèse, les produits organiques marqués élués sont analysés par chromatographie bidimensionnelle avec STA_3 de référence en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (1ère dimension) et en n-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) (2ème dimension). Ces produits marqués par ^{35}S sont vraisemblablement des sulfoconjugués car après hydrolyse chlorhydrique ménagée, ils libèrent en totalité le radioélément sous la forme de sulfates. Ils apparaissent nombreux sur les autoradiochromatogrammes (Fig. 24, A et B) qui par ailleurs montrent leur excellente séparation d'avec STA_3 au terme de cette double chromatographie. Cette observation était importante pour la conduite des études ultérieures dans lesquelles on se proposait la recherche de l'ester sulfurique de TA_3 marqué par ^{131}I et ^{35}S , double marquage dont la preuve exige une élimination totale préalable des autres sulfoconjugués radioactifs.

Sur le document relatif aux urines des animaux traités par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et 10 mg de TA_3 non marqué, deux faibles taches radioactives supplémentaires sont visibles UA 2 et UA 3 (Fig. 24, B) de $R_f = 0,30$ et 0,40 environ en butanol ammoniacal, respectivement 0,65 et 0,61 en butanol-acide acétique, coordonnées qui suggéraient l'identification d'UA₂ à STA_3 de référence.

Expérience II. Chez les animaux injectés de 0,45 μg ou 10 mg de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$ intramusculaire, 15 à 30 % du radioélément injecté sont excrétés en quinze heures par l'urine, les valeurs les plus faibles étant observées après 10 mg de produit. Par électrophorèse d'une partie aliquote de ces urines en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,2 M de pH = 9, sous 200 Volts, 20 mA, deux heures, on établit que 80 à 90 % de cette radioactivité reviennent aux iodures dont le taux paraît plus élevé chez les animaux injectés d'une dose physiologique (Fig. 25, 1 et 2).

Les éluats des produits organiques marqués des urines des deux groupes séparés des sels minéraux par électrophorèse préparative (Fig. 25,4) sont analysés comparativement par chromatographie bidimensionnelle en n-butanol ammoniacal (1ère dimension) et n-butanol-acide acétique (seconde dimension). Les autoradiochromatogrammes de la Fig. 26 témoignent de l'identité des dérivés iodés urinaires dans les deux essais physiologiques (A) ou non (B). Trois d'entre eux seront identifiés par la suite (UA 1, 2 et 3) mais notons dès à présent l'absence en quantité appréciable de TA_3 , ainsi que les coordonnées de UA_1 et UA_2 qui correspondent respectivement à celles de son glycuconjugué (GTA_3) et de son sulfoconjugué (STA_3). En résumé, la radioactivité urinaire après administration intra-musculaire de $TA_3(3'-^{131}I)$ est importante et revient essentiellement aux iodures. Les produits iodés organiques en faible quantité, sont des métabolites de $TA_3(3'-^{131}I)$ et à cet égard, il n'y a pas de différence qualitative entre les animaux traités par une dose physiologique et ceux soumis à un traitement pharmacologique. Cette constatation nous autorisait à les identifier dans les urines de rats ayant reçu une dose de 10 mg de TA_3 entraîneur, laquelle seule, ainsi que nous l'avons vu dans le premier essai après injection de $^{35}SO_4Na_2$, permettait la formation de quantité décelable d'un dérivé de TA_3 marqué par ^{35}S et que nous supposons être $STA_3(^{35}SO_3H-)$.

Expérience III. L'autoradiographie de l'électrophorèse préparative des urines après administration de 10 μC de $^{35}SO_4Na_2$ et 10 mg de $TA_3(3'-^{131}I)$ montre trois zones radioactives (Fig. 25,5) : l'une constituée par $^{35}SO_4^{=}$, les deux autres (a et b) renfermant des produits organiques marqués par les deux radioisotopes. Ils sont élués séparément et chromatographiés préparativement en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. La bande (a) est constituée presque exclusivement du composé iodé UA_1 , la seconde (b) de corps radioactifs soufrés et iodés, à savoir dans ces derniers UA 1, 2, 3 et 4 précédemment concentrés ainsi que des traces de TA_3 (Fig. 27,A,B et radiochromatogrammes A de la Fig. 28). UA_1 a été identifié à GTA_3 antérieurement caractérisé dans la bile (176), par ses $R_f = 0,17$ en n-butanol ammoniacal, 0,30 en collidine-eau (100:35) en atmosphère NH_3 et 0,62 en n-butanol acétique, ainsi que par son hydrolyse par $ClH N$ bouillant qui libère $TA_3(3'-^{131}I)$. Les documents justificatifs correspondants sont rassemblés dans la Fig. 29.

Quant aux métabolites UA_2 et UA_3 , ils ont fait l'objet principal de nos recherches en raison des observations faites au cours de l'expérience I qui suggéraient l'identité de l'un d'eux avec STA_3 . L'éluat 1 de UA_2 (Fig. 27,B,2) est rechromatographié préparativement en n-butanol ammoniacal (Fig. 28,B); le produit soufré et iodé séparé au $R_f = 0,35$ de STA_3 est élué (éluat 2) puis analysé par chromatographie préparative en n-butanol acétique (Fig. 28,C). Une partie aliquote de ce second éluat (éluat 2) est chromatographiée en phase ascendante en collidine-eau en atmosphère NH_3 (Fig. 28,D). Les résultats, illustrés par les radiochromatogrammes différentiels de ^{35}S et ^{131}I mettent en évidence un métabolite renfermant les deux radioéléments et dont les R_f , dans les trois solvants utilisés, concordent avec ceux

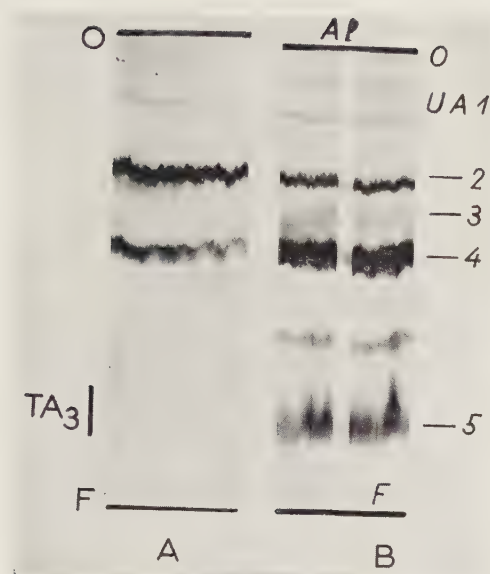


FIGURE 27.

Autoradiographies de chromatogrammes préparatifs en *n*-butanol saturé par NH_4OH 2 N de l'éluat des produits organiques séparés par électrophorèse des urines :

- A. Après injection de $0,45 \mu\text{g}$ TA_3 ($3'\text{-}^{131}\text{I}$).
- B. Après injection de 10 mg TA_3 ($3'\text{-}^{131}\text{I}$) et $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ [éluates rassemblés de la première (a) et de la seconde bande (b) de l'électrophorèse préparative (fig. 25, 5)].

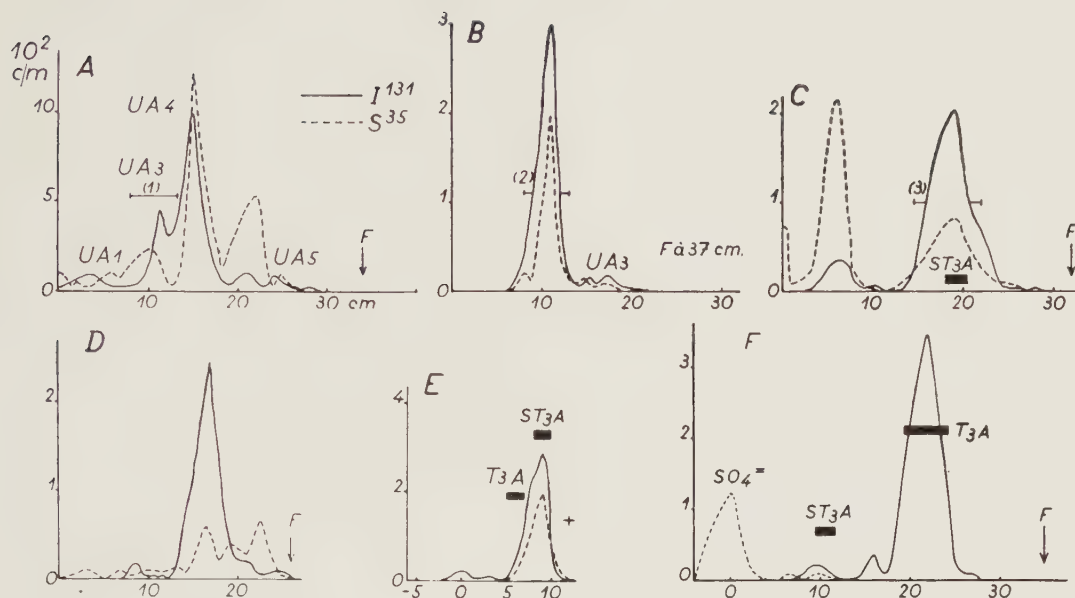


FIGURE 28.

Radiochromatogrammes différentiels de ^{131}I et ^{35}S , dans les dérivés UA_2 , UA_3 des urines de rats traités par 10 mg TA_3 ($3\text{-}^{131}\text{I}$) et $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$:

- Eluat des produits organiques après électrophorèse préparative des urines, analysé en n -butanol saturé par NH_4OH 2 N.
- Elution de UA_3 par le butanol saturé d'eau à $\text{pH} = 10$: éluat 1 chromatographié en n -butanol saturé par NH_4OH 2 N (noter l'apparition en proportion importante de UA_2).
- Eluat 2 de B analysé en n -butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17) et D, le même éluat chromatographié en phase ascendante en collidine-eau (100 : 35) en atmosphère NH_3 .
- Eluat 3 de C analysé par électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$, 0,05 M, $\text{pH} = 9$, 500 V, 30 mA, cinq heures.
- Produit de l'éluat 3 de C après hydrolyse acide ménagée chromatographié en n -butanol saturé par NH_4OH 2 N.

Ordonnées : radioactivité en coups/minute. Abscisses : migration en cm.

T_3A de référence : ancienne nomenclature désignant TA_3 .

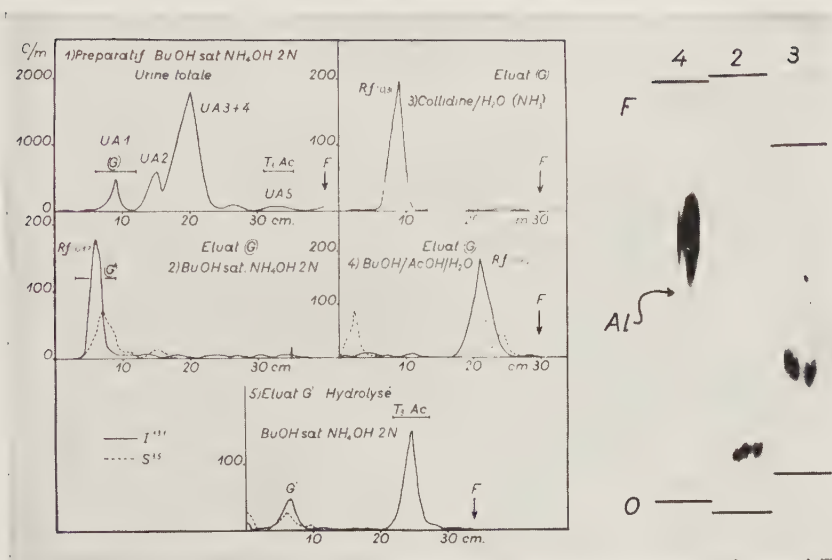


FIGURE 29.

Documents relatifs à l'analyse du composé UA_1 des urines de rats traités par $^{35}SO_4Na_2$ et 10 mg TA_3 ($3^{131}I$) :

1. Chromatographie des produits organiques urinaires élués de l'électrophorèse préparative (radiochromatogramme des produits iodés seuls).
- 2, 3 et 4. Eluat G de 1 analysé dans divers solvants (radiochromatogrammes et autoradiographies correspondantes).
5. Eluat G' de 2 après hydrolyse.

Al : Ecran d'aluminium entre le film et le chromatogramme.

T_3Ac (ancienne nomenclature) : TA_3 de référence.

de STA_3 . Il importait d'en vérifier la pureté et d'en étudier les produits de l'hydrolyse. Dans ce but, la bande radioactive au R_f de STA_3 dans le troisième chromatogramme préparatif (Fig. 28,C,3) a été découpée et éluée (éluat 3). Une partie aliquote de celui-ci est analysée par chromat électrophorèse: (1ère dimension, chromatographie en n-butanol ammoniacal, (seconde dimension), électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 à pH = 9, 500 Volts, 30 mA, cinq heures). L'autoradiographie du document (Fig. 30,A) montre une tache contenant ^{35}S et ^{131}I dans un rapport 1/3 environ (un mois après le début de l'expérience) qui correspond à un corps dont le R_f ainsi que le transport électrophorétique vers l'anode, sont semblables à ceux de STA_3 de référence. La portion restante de l'éluat est soumise à une hydrolyse acide ménagée (ClH 0,1 N, trente minutes au bain-marie à l'ébullition) et dans les produits de celle-ci, l'analyse par chromat électrophorèse identifie $^{35}\text{SO}_4^-$ et $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$. Ces résultats sont illustrés par le document B de la Fig. 30 : SO_4^- de R_f nul en n-butanol-ammoniacal, se déplace vers l'anode à 8 cm de l'origine après électrophorèse en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,2 M, pH = 5, 200 Volts, 20 mA, deux heures, et TA_3 de $R_f = 0,70$ dans le même solvant, subit un transport électrique de 7 cm sous 500 Volts, 30 mA, cinq heures en $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 0,05 M, pH = 9. Une étude entièrement semblable effectuée sur le dérivé UA_3 amène à conclure qu'il est constitué principalement de UA_2 . Leur séparation dans certaines chromatographies préparatives peut résulter d'un artefact dû à la présence de traces de pigment qui par adsorption entraînent une partie seulement du produit, mais on ne peut exclure qu'elle traduise deux états différents de la même molécule. Les autoradiochromatographies A et B de la Fig. 31, correspondent respectivement à l'éluat 3 de UA_3 analysé par chromatographie bidimensionnelle et par chromat électrophorèse. Après hydrolyse acide, UA_3 libère $^{35}\text{SO}_4^-$ et $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$ comme le montre l'autoradiographie C de cette même figure.

Discussion

La proportion très faible des produits organiques marqués de l'urine après administration de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ semble revenir à des sulfoconjugués puisque leur hydrolyse acide ménagée régénère $^{35}\text{SO}_4^-$. Certains d'entre eux possèdent en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N le même R_f que STA_3 de référence dont ils se séparent en n-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) (Expérience I). Cette observation indique la nécessité de l'emploi de deux chromatographies préparatives successives dans ces deux solvants, pour la séparation de STA_3 biologique (Expérience III). D'ailleurs dans l'urine des animaux ayant reçu $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ et 10 mg de TA_3 non marqué, deux faibles taches radioactives supplémentaires sont parfaitement isolées des sulfoconjugués précités (Expérience I) et l'une d'elles paraît être $\text{STA}_3(^{35}\text{SO}_3\text{H}-)$. Il semble donc qu'une dose élevée de TA_3 soit nécessaire, chez des animaux traités par $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, pour l'obtention en quantité appréciable d'un sulfoconjugué radioactif de celui-ci. Or nous avons montré (Expérience III) qu'un tel traitement ne modifie pas la nature des produits organiques de l'excrétion urinaire, puisqu'aussi bien après 0,45 μg qu'après 10 mg de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$ quatre métabolites

principaux sont séparés, possédant les mêmes caractéristiques chromatographiques. Il en résulte que l'identification de ceux-ci, poursuivie dans des conditions physiologiques ou non est indifféremment valable. Nous avons donc isolé le composé UA_2 des urines d'animaux injectés de $^{35}SO_4Na_2$ et 10 mg de $TA_3(3'-^{131}I)$ (Expérience III). Cette séparation a nécessité une électrophorèse et trois chromatographies préparatives successives. UA_2 contenait les deux radioéléments dans un rapport $^{35}S/^{131}I \neq 0,3$ en fin d'expérience. Il possède dans trois solvants chromatographiques et en électrophorèse à $pH = 9$, les mêmes caractéristiques que STA_3 de synthèse (Tableau 8). Par ailleurs, après vérification de sa pureté par chromatographie et électrophorèse combinées, il a été dissocié par action de ClH à chaud en $^{35}SO_4^-$ et $TA_3(3'-^{131}I)$.

Les résultats complémentaires de ces expériences (Tableau 8) nous permettent de conclure que l'ester sulfurique de TA_3 est un des métabolites urinaires naturels du dérivé acétique injecté (TA_3). Au cours de ces recherches nous avons d'autre part établi que l'injection de TA_3 au Rat thyroïdectomisé est suivie de l'excrétion urinaire d'iodures (80 %) accompagnés de petites quantités de dérivés organiques iodés. Parmi ceux-ci, en dehors de STA_3 signalé, de produits non caractérisés et de TA_3 , on a pu identifier (à l'état de traces) le glycuconjugué de ce corps mis en évidence précédemment dans la bile (176).

Nos observations complètent donc le parallélisme établi entre le métabolisme de l'hormone T_3 et celui de son dérivé acétique. Elles indiquent par ailleurs que l'ester sulfurique de TA_3 n'est pas éliminé préférentiellement aux autres métabolites de TA_3 , par la voie urinaire non plus que celui de l'hormone correspondante (ST_3) qui, présent ou non dans l'urine, ne peut y être qu'en très minimes quantités.

Résumé

Nous avons établi que les produits urinaires du métabolisme de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique marqué en 3' par ^{131}I , administré à dose physiologique ou non au Rat thyroïdectomisé, comprenait 80-90 % d'iodures à côté de petites quantités de produits organiques iodés, parmi lesquels TA_3 et ses dérivés de conjugaison avec l'acide glycuronique et l'acide sulfurique. Ce dernier, isolé par électrophorèse et chromatographie préparatives successives des urines d'animaux traités par $^{35}SO_4Na_2$ et 10 mg de $TA_3(3'-^{131}I)$, a été obtenu pur en chromatographie électrophorèse. Il renfermait ^{35}S et ^{131}I dans un rapport voisin de celui de STA_3 isolé de la bile dans les mêmes conditions. Il a été identifié à celui-ci obtenu par synthèse, grâce à la concordance de leur R_f dans trois solvants, à la similitude de leur transport électrophorétique et par l'analyse des produits de son hydrolyse acide ménagée qui le dissocie en libérant $^{35}SO_4^-$ et $TA_3(3'-^{131}I)$. Ces données sur la nature des produits urinaires dérivés de TA_3 , fournissent une preuve supplémentaire de la ressemblance existant entre son métabolisme et celui de son précurseur hormonal, et montrent que l'excrétion urinaire n'est pas une voie préférentielle pour l'élimination de STA_3 .

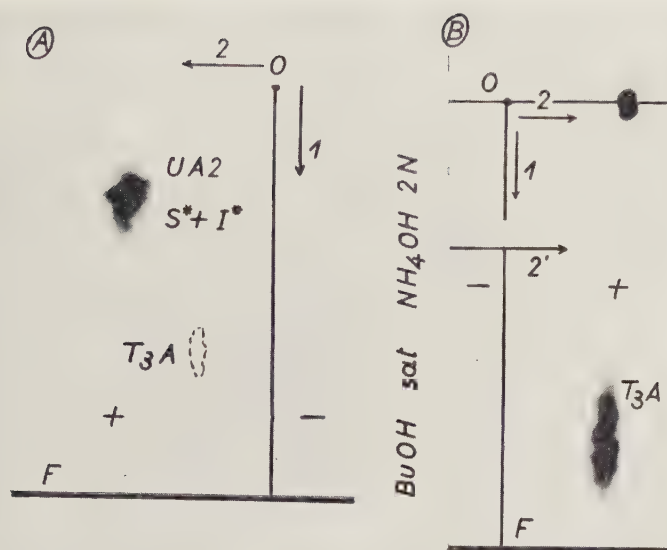


FIGURE 30.

Autoradiochromatoélectrophorègrammes du composé UA_2 isolé au moyen de trois chromatographies préparatives successives (fig. 28, A, B, C) des urines de rats traités par $^{35}SO_4Na_2$ et 10 mg TA_3 ($3\text{'-}^{131}I$) :

- A. UA_2 analysé par chromatographie en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (première dimension) et électrophorèse à $pH = 9$ sous 500 V, pendant cinq heures (seconde dimension).
- B. Les produits de l'hydrolyse acide de UA_2 soumis à une chromatographie en butanol ammoniacal (première dimension) et à une électrophorèse à $pH = 9$ (seconde dimension) sous 200 V (2) et sous 500 V (2').

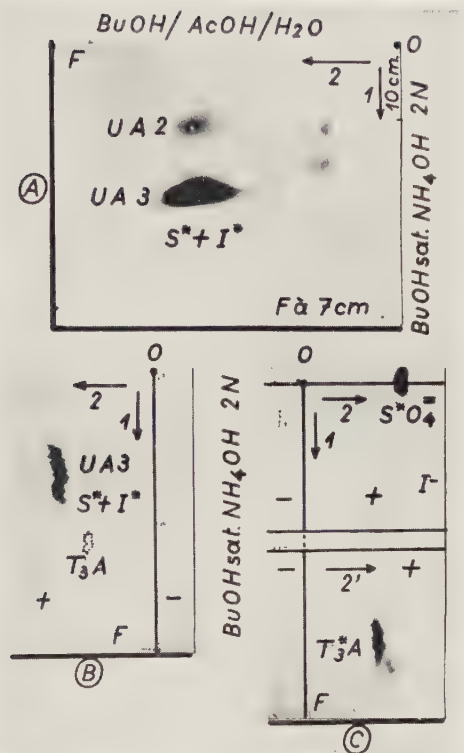


FIGURE 31.

Urine de rats injectés de 10 mg TA_3 ($3'$ - ^{131}I) et $^{35}SO_4Na_2$. Autoradiographies de UA_3 élué d'un chromatogramme préparatif en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (fig. 27. B) et analysé :

- Par chromatographie bidimensionnelle 1 : n-butanol saturé par NH_4OH 2 N, et 2 : n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17).
- Par chromatographie électrophorèse après élution de (A) : chromatographie en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (première dimension : 1) et électrophorèse en $CO_3(NH_4)_2$, 0,05 M sous 500 V, pendant cinq heures (seconde dimension : 2).
- Par chromatographie électrophorèse après élution de A et hydrolyse acide ménagée : chromatographie en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (1) et électrophorèse en $CO_3(NH_4)_2$, 0,2 M, pH = 9, sous 200 V, deux heures (2) et en $CO_3(NH_4)_2$, 0,05 M, pH = 9 sous 500 V, cinq heures (2').

(T_3A : Ancienne nomenclature pour désigner TA_3 . S^* et I^* : respectivement ^{35}S et ^{131}I .)

Tableau 8

Solvants	Produits analysés	TA ₃	STA ₃	GTA ₃ (bile)	UA ₁	UA ₂	UA ₃
n-BuOH saturé par NH ₄ OH 2 N		0,70	0,32	0,17	0,15	0,30	(0,40) 0,30
n-BuOH-AcOH-H ₂ O (78:5:17)		0,95	0,62	0,63	0,62	0,61	0,61
Collidine-H ₂ O (100,35) atm. NH ₃		0,80	0,65	0,33	0,30	0,65	0,65
Migration en cm vers l'anode : CO ₃ (NH ₄) ₂ 0,05 M pH = 9 , 500 V., 5 heures		7	9	-	-	9	8-9
Produits de l'hydrolyse		-	TA ₃	TA ₃	TA ₃	TA ₃ *SO ₄	TA ₃ *SO ₄

CONCLUSIONS DE LA SECONDE PARTIE

L'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique, produit du métabolisme normal de T₃ (40, 43, 173, 175, 177), possède des propriétés hormonales et se comporte à différents égards de manière très semblable à son précurseur biologique. Il est comme lui lié aux protéines sériques (99), il diffuse rapidement du sang vers les espaces extracellulaires (99, 173) et sa distribution tissulaire ressemble à celle de T₃ (173, 176). Comme T₃, TA₃ est déshalogéné plus rapidement que la thyroxine (41, 99, 173), et de même que les iodothyronines, il subit dans des conditions physiologiques, une glycuconjugaison hépatique (41, 176). On pouvait dès lors envisager l'existence d'une sulfoconjugaison de TA₃ et se demander si son produit n'était pas l'un des métabolites signalé dans la bile du Rat traité par ce dérivé (176).

Dans le but de vérifier cette hypothèse et de compléter la comparaison entre le métabolisme de T₃ et celui de son dérivé acétique, nous avons conduit le concernant des recherches parallèles à celles effectuées pour la mise en évidence de ST₃.

Nous avons préparé l'ester sulfurique de TA₃ (STA₃) et nous en avons étudié certaines propriétés chromatographiques et électrophorétiques. Il devait nous servir de corps de référence dans nos recherches biologiques lesquelles ont été conduites suivant une méthode analytique absolument semblable à celle utilisée pour l'étude des métabolites de T₃.

Nous avons ainsi établi que chez le Rat traité par une dose physiologique de $TA_3(3'-^{131}I)$, un des métabolites principaux de la bile et du sang était l'ester sulfurique du produit injecté. Dans ces conditions, STA_3 semble se former en quantité plus importante que le glycoconjugué (GTA_3) et l'inverse est observé chez l'animal traité par une dose pharmacologique du dérivé acétique.

Normalement le glycoconjugué de TA_3 , comme celui de T_3 , ne semble exister dans le sang qu'à l'état de traces. Il n'en est pas de même des esters sulfuriques correspondants et ceci laisse supposer que leur élimination rénale est faible. L'analyse des produits urinaires marqués du métabolisme de $T_3(3'-^{131}I)$, avait effectivement montré que ceux-ci étaient constitués à peu près exclusivement de $^{131}I^-$ accompagné d'une infime proportion de dérivés organiques (41, 56). Nous avons pensé qu'il était intéressant de voir s'il en était de même après injection de $TA_3(3'-^{131}I)$. Dans les produits urinaires du Rat ainsi traité, nous avons montré que plus des trois quarts de la radioactivité revenaient aux iodures. Dans les produits organiques de cette excrétion, nous avons identifié principalement $STA_3(3'-^{131}I)$. Ce sulfoconjugué, non plus que celui de T_3 , n'est donc éliminé en quantité importante par la voie urinaire.

L'existence dans des conditions physiologiques d'une sulfoconjugaison de T_3 et de TA_3 , la présence de leur produit dans le sang et la faible excrétion de ceux-ci par les urines, soulèvent le problème de la signification biologique de ce processus. On peut se demander en effet s'il s'agit d'un mécanisme de détoxication inactivant la substance hormonale ou facilitant sa dégradation et son élimination. La première hypothèse ne peut être vérifiée que par une étude comparée des activités biologiques de T_3 , TA_3 et de leurs sulfoconjugués. Semblables recherches sortaient du cadre de notre travail. La seconde pouvait être abordée par l'étude du métabolisme de ces conjugués : la troisième partie de notre travail concerne celui de ST_3 .

*

*

*

TROISIEME PARTIE

Métabolisme de l'ester sulfurique de T_3 (ST_3) chez le Rat thyroïdectomisé

INTRODUCTION

Les résultats des recherches exposées dans les deux premières parties de notre travail et ceux des études antérieures sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes et du dérivé TA_3 (116, 205) permettent de considérer que leur conjugaison hépatique est une voie essentielle de leur métabolisme. Elle s'effectue soit avec l'acide glycuronique, soit avec l'acide sulfurique.

Il est classique de considérer que la conjugaison fait partie de la fonction de détoxification du foie, vis-à-vis des phénols toxiques liposolubles convertis de la sorte en dérivés hydrosolubles plus aisément éliminés (79, 224).

La signification biologique de la glycuconjugaison des iodothyronines nous paraît un peu différente. En effet, GT_4 excrété par la bile dans le tube digestif n'est pas un produit de détoxification éliminé tel que : une fraction en est résorbée et une autre est hydrolysée avec récupération partielle de l'hormone régénérée (15, 17, 205). Par analogie et avec l'appui de certaines observations, on doit admettre que GT_3 (116, 156, 178, 179) GT_2 et GTA_3 se comportent de même. La conjugaison des iodothyronines constitue donc plus exactement un processus régulateur de l'hormonémie avec économie partielle d'hormone ou de dérivé hormonal.

Le rôle biologique de leur sulfoconjugaison n'est pas évident pour des raisons déjà mentionnées, et qui permettaient d'envisager l'utilisation de ses produits par l'organisme. La mise en évidence de l'ester sulfurique de la tyrosine, éliminé par l'urine (197), dans la constitution du fibrinogène (10) et l'hydrolyse in vivo du sulfate d'oestrone (59) soutenaient cette hypothèse. Il en est de même du fait que les arylsulfatases très répandues dans le règne animal, restent encore sans substrats biologiques connus (32, 186, 192).

Les recherches de ces dernières années ont principalement conduit à élucider le mécanisme des conjugaisons (79) avec l'acide glycuronique (78) et avec l'acide sulfurique (26, 27), mais non à préciser le métabolisme des conjugués tout au moins en ce qui concerne ceux des substances douées d'activité biologique.

Nous avons donc considéré intéressante l'étude du métabolisme des sulfoconjugués des hormones thyroïdiennes. Celui de T_3 a été choisi

en raison de l'importance biologique primordiale de cette hormone et du fait que sa synthèse s'effectue avec un rendement satisfaisant. Il était dès lors possible de le préparer avec une radioactivité spécifique suffisante pour des recherches dans des conditions presque physiologiques. Nous avons préparé ST_3 marqué en 3' par ^{131}I ce qui facilitait une étude comparée avec le métabolisme de $T_3(3'-^{131}I)$ objet de nombreux travaux antérieurs (116).

Cette troisième partie de notre travail aborde le problème du devenir de $ST_3(3'-^{131}I)$ introduit dans l'organisme par voie veineuse et par voie duodénale. Nous nous sommes adressé à des rats thyroïdectomisés pour éviter l'apparition d'hormones marquées d'origine endogène et consécutives à l'utilisation par la thyroïde de ^{131}I résultant de la déshalogénéation possible du produit injecté. Par ailleurs, ces animaux ont nécessairement une hormonémie inférieure à la normale et ceci nous autorisait à leur administrer des doses plus élevées que celles requises pour être dans des conditions physiologiques chez l'animal intact.

Un premier chapitre concerne la cinétique de l'excrétion de $ST_3(3'-^{131}I)$, le suivant envisage l'identification de ses métabolites sanguins, biliaires et urinaires. Les deux suivants sont consacrés à la répartition tissulaire de la radioactivité après injection veineuse du produit ainsi qu'à sa résorption et à son excrétion après administration intra-duodénale.

*

*

*

CHAPITRE I

Métabolisme comparé de ST_3 et T_3 administrés par voie veineuse

Nous avons établi précédemment que l'injection de T_3 à doses physiologiques est suivie de l'apparition dans le sang du Rat d'une quantité importante de ST_3 . On peut se demander ce que devient cet ester sulfurique sanguin de l'hormone. Pour répondre à cette question nous avons étudié la cinétique de l'excrétion de ^{131}I après injection veineuse de $ST_3(3'-^{131}I)$ et elle a été comparée à celle obtenue dans les mêmes conditions avec $T_3(3'-^{131}I)$. La nature des produits excrétés a été précisée dans ce chapitre en ce qui concerne le taux des iodures, et l'identification des produits organiques marqués est abordée dans le suivant.

Préparation de $ST_3(3'-^{131}I)$ et de $T_3(3'-^{131}I)$

La synthèse de ces corps marqués a été conduite ainsi que nous l'avons décrit antérieurement (Première partie Chapitre I). Les produits de la réaction ont été séparés par chromatographie et électrophorèse préparatives. Le produit de l'éluat final de celles-ci est évaporé jusqu'à siccité sous pression réduite en atmosphère d'azote et à température inférieure à $40^{\circ}C$. Le résidu sec est alors repris par quelques gouttes de $NaOH$ 0,2 N, porté à un volume connu par addition d'eau et la solution est amenée à $pH = 9$. La radioactivité des produits obtenus est mesurée sur une partie aliquote ce qui permet - après avoir calculé leur activité spécifique ($0,67 \mu C/\mu g$ de ST_3 et $0,44 \mu C/\mu g$ de T_3) - d'ajuster le volume des solutions de manière à obtenir une concentration en produit marqué de $0,3 \mu g/100 \mu l$. La pureté de ST_3 et de T_3 marqués est alors contrôlée par chromatographie et le taux des iodures y est déterminé par une électrophorèse. Celle-ci en $CO_3(NH_4)_2$ 0,2 M, $pH = 9$, sous 200 Volts et 25 mA pendant deux heures, sépare parfaitement $^{131}I^-$ de $T_3(3'-^{131}I)$ et de $ST_3(3'-^{131}I)$. Une autoradiographie permet le repérage précis sur le papier des taches revenant aux uns et aux autres. Elles sont découpées et leur radioactivité respective mesurée au compteur à scintillation avec cristal creux ($NaI-Tl$, Tracerlab). Dans les solutions injectées, ^{131}I représentait moins de 1 % de la radioactivité totale, ce qui a nécessité parfois plusieurs purifications électrophorétiques. La solution de $ST_3(3'-^{131}I)$ a été soumise à un contrôle supplémentaire par chromatographie du produit avant et après hydrolyse acide ménagée régénérant $T_3(3'-^{131}I)$. Les solutions ont été utilisées immédiatement ou moins de 24 heures après leur préparation et dans ce cas, conservées à $-15^{\circ}C$ afin d'éviter une déshalogénation de la molécule ou sa dénaturation par des contaminations microbiennes.

Excrétion urinaire et fécale

Six rats reçoivent par voie intra-veineuse $0,6 \mu\text{g}$ de $\text{ST}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ par 100 g de poids du corps et sont alors logés dans des cages à métabolisme permettant la récolte séparée des urines et des fèces. Celle-ci est poursuivie de manière fractionnée pendant quatre jours. Un lot de six animaux est suivi de même après administration veineuse de $0,5 \mu\text{g}$ de $\text{T}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ par 100 g . La radioactivité totale des échantillons individuels d'urine est calculée à partir d'une mesure effectuée sur un prélèvement de 2 ml passé au compteur à scintillation cristal creux. La totalité des fèces est répartie par fractions de 2 ml dans autant de tubes que nécessaire, et les résultats des mesures de radioactivité sont additionnés. Un étalon de la solution injectée est préparé de manière à obtenir une radioactivité mesurable dans un volume identique à ceux des prélèvements biologiques. La radioactivité de ceux-ci est comparée à celle de la solution de référence mesurée dans le même temps et les résultats sont exprimés en pour-cents de la dose totale administrée et de manière cumulative en fonction du temps. Les valeurs moyennes obtenues sont données par le graphique de la Fig. 32. Le taux des iodures a été établi dans divers échantillons d'urine, par analyse électrophorétique comme décrit précédemment. Les résultats en sont consignés dans le tableau 9; ils montrent que la radioactivité urinaire après injection de $\text{ST}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ ou $\text{T}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ est essentiellement due à $^{131}\text{I}^-$ (80 à 90 %). L'importance de cette excrétion et sa cinétique ont été illustrées par le graphique de la Fig. 32, qui fournit également les résultats relatifs à l'excrétion par le tube digestif. Dans les matières fécales, la radioactivité appartient sans doute à des composés organiques, car mis en présence de protéines plasmatiques, ils précipitent avec elles à concurrence de 70 à 80 % alors que tel n'est pas le cas avec $^{131}\text{I}\text{Na}$ et que par ailleurs, ainsi que nous l'établirons plus loin, ST_3 (de même que T_3) se lie aux protéines du sang et est précipitable avec elles.

Discussion. Pour être autorisé à comparer l'excrétion radioactive urinaire et fécale après injection de $\text{ST}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$ et $\text{T}_3(3'\text{-}^{131}\text{I})$, de même que pour en discuter les résultats, il importait d'abord de préciser la nature des constituants radioactifs dans les deux séries expérimentales et principalement d'établir le taux des iodures.

L'urine des animaux des deux expériences contient presque exclusivement $^{131}\text{I}^-$: elle est donc semblable du point de vue qualitatif. Par ailleurs si la radioactivité totale excrétée par cette voie est légèrement supérieure chez les animaux traités par T_3 , cette différence n'est cependant pas statistiquement valable : dans les deux cas l'excrétion urinaire est donc de même importance quantitative.

Chez un animal thyroïdectomisé, l'hypothyroïdie peut ralentir l'excrétion rénale des iodures par diminution de la diurèse et de la clearance de cet organe vis-à-vis de ceux-ci (221), il n'en reste pas moins que les reins les concentrent et les éliminent encore très rapidement. Vingt-quatre heures après l'administration à de tels animaux de $^{131}\text{I}\text{Na}$ traceur ou avec entraîneur, nous avons observé que moins de

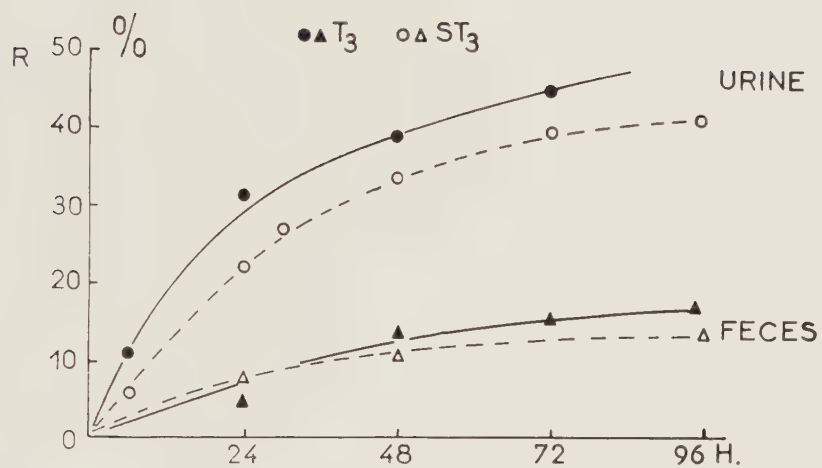


FIGURE 32.

Cinétique de l'excrétion urinaire et fécale de ^{131}I , chez le rat thyroïdectomisé après injection par voie veineuse de T_3 ($3^3\text{.}^{131}\text{I}$) et ST_3 ($3^3\text{.}^{131}\text{I}$) à la dose de 0,5 et 0,6 $\mu\text{g}/100$ g de poids.

En abscisses, le temps en heures après le traitement, et en ordonnées, les valeurs cumulatives moyennes de la radioactivité en pourcents de celle administrée.

30 % de la radioactivité sont retenus dans le sang et les tissus. Après trois, quatre jours on peut considérer que plus de 90 % des iodures injectés ont été excrétés et ce, essentiellement par la voie urinaire. En conséquence, chez nos animaux, la quantité totale de ^{131}I Na éliminée en quatre jours par les reins permet avec une approximation satisfaisante de chiffrer le taux comparatif de déshalogénéation de $\text{ST}_3(3'-^{131}\text{I})$ et de $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$ d'autant plus que les solutions injectées contenaient moins de 1 % de ^{131}I Na. Dans l'un et l'autre cas il est semblable et de l'ordre de 40 à 45 % en quatre jours.

Administrés par voie veineuse à la dose de 0,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, ST_3 de même que l'hormone correspondante T_3 , sont donc déshalogénés aussi rapidement du moins en ce qui concerne l'iode en position 3' : cette restriction s'impose car il a été établi que la labilité des iodes de la molécule est différente suivant leur position (150, 183). Nos observations démontrent également que l'estérification sulfurique de ST_3 ne favorise ni l'excrétion rénale de l'hormone ni celle des produits organiques de sa désioduration. En effet, $\text{ST}_3(3'-^{131}\text{I})$ n'est pas éliminé tel que par les reins, il subit une déshalogénéation portant sur l'iode radioactif en 3' et c'est le produit de celle-ci qui constitue la part la plus importante de la radioactivité urinaire comme dans le cas de $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$. Si on postule qu'une hydrolyse préalable de la fonction ester n'est pas nécessaire à cette désioduration, on doit envisager que cette dernière va produire un ou des sulfoconjugués de thyronine moins halogénée qui ne seront plus marqués : nous ne pourrons dès lors en préciser la vitesse d'élimination mais cependant, il est très difficile de concevoir qu'elle puisse être supérieure à celle de $^{131}\text{I}^-$ perdu par $\text{ST}_3(3'-^{131}\text{I})$ au cours de ce catabolisme. Quant à l'excrétion radioactive fécale elle est la résultante d'une part de la sécrétion biliaire et digestive du produit injecté et de ses métabolites marqués, d'autre part, de la résorption partielle de ceux-ci par l'intestin (1, 15, 17, 156, 205). Cette résultante est quantitativement semblable dans les deux expériences et du point de vue qualitatif, on note chez les animaux traités par $\text{ST}_3(3'-^{131}\text{I})$ de même que chez ceux traités par $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$, une fraction d'égale importance précipitable avec les protéines. Après l'identification chez les uns et les autres des produits de l'excrétion biliaire, ces faits seront discutés, mais déjà on peut noter que l'ester sulfurique n'est pas éliminé par le tube digestif préférentiellement à l'hormone correspondante.

En conclusion, $\text{ST}_3(3'-^{131}\text{I})$ n'est pas éliminé plus rapidement que T_3 marqué de même, ni par les reins ni par le tube digestif. Il n'est pas excrété tel que par la voie urinaire et les produits marqués de cette excrétion sont constitués, comme après traitement par $\text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$, par $^{131}\text{I}^-$ qui représente plus des trois quarts de la radioactivité. L'excrétion radioactive fécale après injection de l'un et l'autre de ces produits est quantitativement semblable et comporte principalement des dérivés précipitables avec les protéines.

*

*

*

Tableau 9

Excrétion urinaire comparée après injection veineuse de $ST_3(3'-^{131}I)$ ($0,6 \mu g/100 g$) et de $T_3(3'-^{131}I)$ ($0,5 \mu g/100 g$) : A , radioactivité totale des divers échantillons d'urine en pour-cents de la dose administrée (moyennes sur six animaux) et B , taux moyen de $^{131}I^-$ dans chacun d'eux.

A			B		
Radioactivité totale excrétée			Taux des iodures radioactifs		
Temps en heures	ST_3	T_3	Temps en heures	ST_3	T_3
0 - 6	4,1	11	0 - 6	89,5	74,5
6 - 24	18,2	21,4	6 - 24	92	87,5
24 - 48	11,6	6,6	24 - 30	93	92
48 - 72	5,9	5,8	Solutions injectées # 1		
72 - 96	1,3	-			

Excrétion biliaire

On réalise une fistule biliaire à la peau chez cinq rats, par mise en place sous anesthésie au pentothal, d'un tube de polythène dans le canal cholédoque suivant une technique antérieurement décrite (225). A partir de la zone opératoire le tube est glissé par voie sous-cutanée vers la région dorsale pour s'ouvrir à la peau dans l'espace inter-scapulaire et la bile est récoltée dans un bissac en verre fixé au dos de l'animal. Les animaux ont été traités par administration veineuse de $0,6 \mu g ST_3(3'-^{131}I)$ par 100 g de poids du corps. La bile a été prélevée de manière fractionnée au cours des vingt-quatre premières heures et la radioactivité des échantillons mesurée et exprimée comme décrit dans l'expérience précédente. Les résultats sont comparés à ceux qui ont été obtenus précédemment par nous et par d'autres (156), dans des conditions analogues chez des animaux traités par $T_3(3'-^{131}I)$. Le graphique de la Fig. 33 rassemble ces résultats et montre une excrétion globale de ^{131}I nettement inférieure dans le cas des rats injectés par $ST_3(3'-^{131}I)$. Cette différence semble ne s'affirmer que tardivement après l'injection si on en juge d'après les deux courbes présentées.

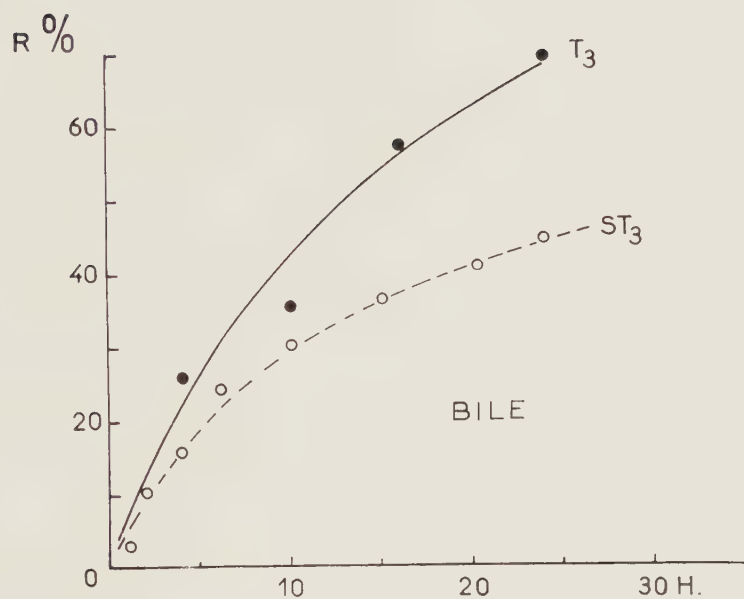


FIGURE 33.

Cinétique de l'excrétion radioactive biliaire, chez le rat thyroïdectomisé après injection veineuse de ST_3 ($3'\text{-}^{131}\text{I}$) comparée à celle consécutive à l'administration sous-cutanée de T_3 ($3'\text{-}^{131}\text{I}$) ($0,6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$).

En abscisses, le temps en heures après le traitement, et en ordonnées, les valeurs cumulatives moyennes de la radioactivité en pourcents de celle injectée.

On ne peut cependant tirer de telles conclusions car la courbe témoin T_3 a été obtenue chez des animaux traités par voie sous-cutanée. La similitude d'excrétion dans les premières heures correspond donc très certainement à la résorption plus lente de l'hormone qui diminue artificiellement le taux de son excrétion par rapport à celle de ST_3 injecté en intra-veineuse.

Divers prélèvements de la bile de rats injectés de ST_3 ont été analysés par électrophorèse afin d'en déterminer le taux de $^{131}I^-$. Celui-ci est très faible, comme l'indiquent les résultats consignés dans le tableau 10, et est du même ordre de grandeur que celui observé dans la bile après traitement par $T_3(3'-^{131}I)$ (153, 156).

Tableau 10

Pourcentage des iodures présents dans la bile du Rat thyroïdectomisé à des temps différents après l'injection intra-veineuse de $ST_3(3'-^{131}I)$

Produit analysé	Temps après l'injection	$^{131}I^-$ en % de la radioactivité totale de l'échantillon :
Bile	0 - 2 h	2,3
	4 - 6 h	4,5
	6 - 10 h	6,1
	15 - 20 h	9,0

Discussion. La radioactivité totale excrétée par la bile après injection de $ST_3(3'-^{131}I)$ est moindre que celle consécutive à un traitement par $T_3(3'-^{131}I)$. Dans les deux cas, elle revient presque entièrement à des produits organiques marqués, celui administré et ses dérivés métaboliques, puisque le taux de $^{131}I^-$ y est très faible. Or l'élimination radioactive fécale, chez les rats de ces deux groupes expérimentaux, est de valeur semblable et peu importante par rapport à celle déversée par la bile dans l'intestin. Il en résulte que dans les deux cas, il doit y avoir une résorption intestinale partielle des produits organiques radioactifs de la bile et que celle-ci doit être plus importante chez les animaux ayant reçu l'hormone que chez ceux traités par son ester sulfurique. Chez ces derniers cependant, cette résorption intestinale n'est pas négligeable, il importait donc de préciser la nature des produits ainsi repris par l'organisme. En effet, ou bien ST_3 injecté est tel, éliminé par la bile, et dans ce cas c'est lui qui est résorbé par l'intestin; ou bien il est préalablement métabolisé et le foie en déverse les métabolites dans l'intestin qui les récupère partiellement. L'une et l'autre hypothèse paraissent peu compatibles avec l'idée que l'estérification sulfurique de T_3 correspond à un processus classique de détoxification et par ailleurs il en est de même du fait que ST_3

n'est pas éliminé par le parenchyme hépatique plus rapidement que l'hormone dont il dérive.

Résumé

Nous avons montré que $ST_3(3'-^{131}I)$ administré par voie veineuse au Rat thyroïdoprive ($0,6 \mu g/100 g$) est éliminé par les urines et les fèces de manière semblable à son précurseur biologique T_3 marqué de même. Les produits marqués de l'excrétion rénale de ST_3 ainsi marqué se composent presque exclusivement d'iodures : ST_3 est donc métabolisé par l'organisme. Dans nos conditions expérimentales, le taux de la déshalogénéation de ST_3 est semblable à celui de T_3 , du moins en ce qui concerne l'iode en position $3'$.

L'excrétion radioactive biliaire après injection de $T_3(3'-^{131}I)$ est quantitativement supérieure à celle qui suit l'administration de $ST_3(3'-^{131}I)$. Dans les deux cas, elle est constituée presque entièrement de produits organiques qui sont partiellement résorbés par l'intestin. Ceux dérivés de ST_3 l'étant moins que ceux provenant de T_3 , il en résulte une élimination radioactive fécale de même importance chez les animaux des deux groupes.

Il apparaît de ces premières observations que ST_3 n'est pas éliminé plus rapidement que l'hormone correspondante et qu'il est en partie utilisé par l'organisme.

*

*

*

CHAPITRE II

Nature des produits du métabolisme de ST_3 et liaison de celui-ci avec les protéines sériques

Introduction

Dans le précédent chapitre nous avons établi que ST_3 était partiellement métabolisé puisque subissant une désioduration rapide. Nous avons étudié la cinétique de son excrétion biliaire et montré que celle-ci comportait uniquement des produits organiques marqués. Ils sont déversés dans l'intestin et partiellement résorbés. Il était par conséquent intéressant de préciser la nature des métabolites biliaires et plasmatiques des animaux traités par $ST_3(3'-^{131}I)$. Par ailleurs, on sait que la faible solubilité des hormones thyroïdiennes au pH du sang, pH voisin de la neutralité, est faible mais compensée par la liaison de celles-ci avec certaines fractions protéiques du plasma (6, 31, 46, 77, 141). On sait par ailleurs que la stabilité de ces liaisons protéiques varie avec la nature de la protéine en cause et celle de l'hormone (3, 96, 98, 99, 140, 141) et modifie la vitesse de diffusion extravasculaire ainsi que la pénétration intracellulaire de celle-ci (41, 99, 141, 188, 189, 195). Il était donc nécessaire de préciser le comportement de ST_3 vis-à-vis des protéines plasmatiques avant que d'aborder l'étude de sa distribution tissulaire. Ces recherches font l'objet de ce second chapitre.

Nature des métabolites biliaires de $ST_3(3'-^{131}I)$

L'analyse des produits biliaires du métabolisme de $ST_3(3'-^{131}I)$ a été effectuée à partir de prélèvements recueillis au cours des recherches décrites dans le chapitre I. Les échantillons obtenus au même temps chez les cinq rats ont été rassemblés et une partie aliquote de certains de ces prélèvements moyens a été chromatographiée en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (dépôt de 50 μl de bile par cm de long sur papier Whatman n° 1) et en phase ascendante en collidine-eau (100:35) en atmosphère saturée par NH_3 (dépôt de 100 $\mu l/cm$ de long). T_3 et I^- ont été placés en parallèle comme corps de référence et les chromatogrammes ont été révélés par autoradiographie. L'examen des autoradiochromatogrammes (Fig. 34) montre dans les deux solvants utilisés, trois taches d'intensité relative variable en fonction du temps du prélèvement. Deux de celles-ci correspondent à des composés connus à savoir ST_3 et le glycuconjugué de T_3 (GT_3). Les iodures en très faible proportion comme nous l'avons dit, ne sont visibles que sur certains documents. Pendant les trois premières heures après l'injection (Fig. 34, I, II) la bile ne renferme pratiquement que ST_3 ; par après, le taux de GT_3 augmente pour atteindre près de 50 % de la ra-

radioactivité totale du chromatogramme dans l'excrétion de la dixième à la vingtième heure (Fig. 34, I, 4). Il apparaît semble-t-il plus précocement dans la bile après injection intra-duodénale de $ST_3(3'-^{131}I)$ ainsi qu'en témoigne l'autoradiochromatogramme B de la Fig. 34 correspondant à l'analyse d'un échantillon de bile des deux premières heures chez deux animaux (180 et 200 g) ayant reçu par cette voie 4 μg de $ST_3(3'-^{131}I)$ et dans lequel GT_3 , ST_3 et I^- représentent respectivement 15, 70 et 5 % de la radioactivité totale (expérience rapportée au chapitre IV).

Nature des métabolites sanguins de $ST_3(3'-^{131}I)$

Douze rats thyroïdectomisés ont reçu par voie veineuse et par 100 g de poids 0,6 μg de $ST_3(3'-^{131}I)$ (0,67 μC par μg). Ils sont sacrifiés par groupe de trois, cinq minutes, une heure, trois heures et six heures après le traitement. Le sang a été recueilli sous héparine et le plasma séparé par centrifugation. Une partie aliquote des quatre échantillons de plasma a été prélevée pour la détermination du taux des iodures par électrophorèse sur papier : $CO_3(NH_4)_2$ 0,2 M pH = 9, 200 Volts, 25 mA, deux heures - dépôt 30-50 $\mu l/3$ cm sur papier Whatman n° 3MM. Les résultats obtenus à ce sujet sont indiqués dans le tableau 11.

Tableau 11

Pourcentages des radioiodures présents dans le plasma du Rat thyroïdectomisé à des temps différents après l'injection veineuse de $ST_3(3'-^{131}I)$

Plasma	5 min.	5,5
	1 h.	2,6
	3 h.	11,6
	6 h.	17,0
$ST_3(3'-^{131}I)$ (solution injectée)	0,5	

Le plasma restant a été lyophilisé et extrait comme décrit précédemment (1ère Partie, Ch. III). Les produits de cette extraction ont été chromatographiés en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. On observe sur les autoradiochromatogrammes correspondants (Fig. 35) que le constituant principal est ST_3 (80-90 %) accompagné d'iodures (5-15 %) surtout visibles à la sixième heure et d'un autre dérivé non identifié existant à l'état de trace dont le R_f dans le solvant employé est voisin de celui de GT_3 .

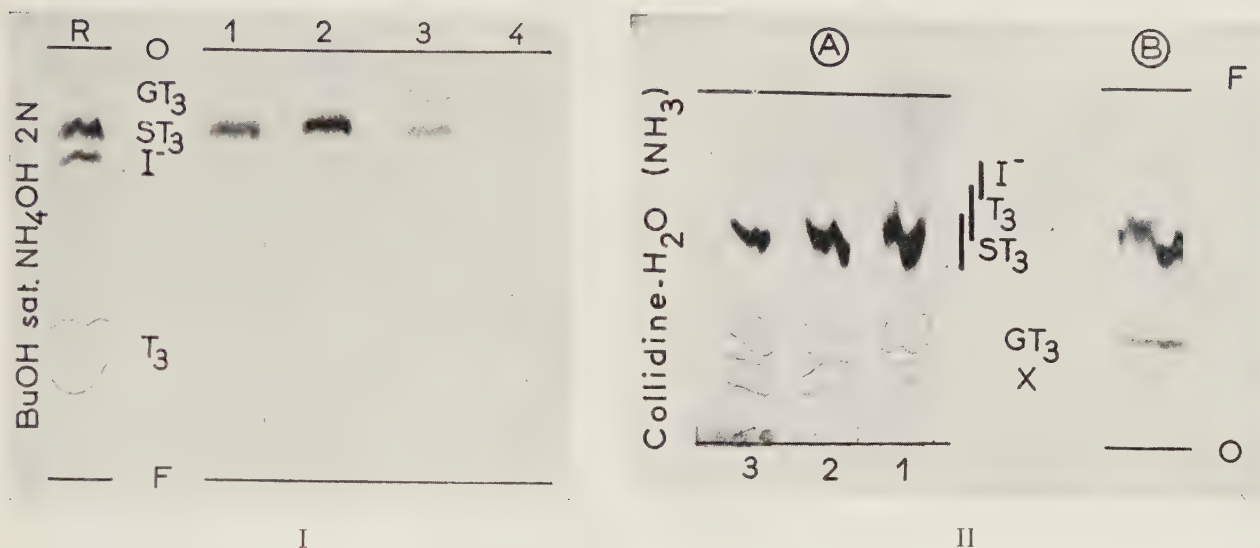


FIGURE 34.

Autoradiochromatogrammes de divers prélèvements de bile après injection veineuse de ST_3 ($3^{\cdot 131}\text{I}$), analysés en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N (I) et en collidine-eau (100 : 35) en atmosphère NH_3 (II, A).

1) bile de 0-1 heure; 2) bile de 1-3 heures; 3) bile de 3-5 heures; 4) bile de 10-20 heures.

II,B : autoradiochromatogramme de la bile des deux premières heures, après injection intraduodénale de $4 \mu\text{g}$ ST_3 ($3^{\cdot 131}\text{I}$), analysée en collidine-eau en atmosphère NH_3 .

R = chromatogramme des corps de référence (T_3 , ST_3 et I^-) en solution dans la bile de rat non traité, et analysé en butanol ammoniacal.

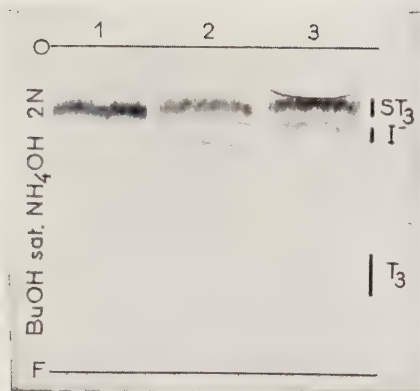


FIGURE 35.

Autoradiochromatogramme des extraits plasmatiques analysés en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N. Le plasma a été prélevé cinq minutes (1), trois heures (2) et six heures (3) après administration intraveineuse de ST_3 ($3',131I$).
 ST_3 , T_3 et I^- : Position des corps de référence.

Discussion. Pendant les trois premières heures après l'injection veineuse de $ST_3(3'-^{131}I)$ le produit administré est pratiquement le seul constituant marqué de la bile et du sang exception faite des iodures. Ultérieurement d'autres dérivés organiques apparaissent. ST_3 est donc progressivement métabolisé. Le métabolite principal analysé par chromatographie s'identifie dans deux solvants différents à un glycuconjugué (153, 176). En effet, chromatographié dans ces solvants, il possède le même R_f que le glycuconjugué de T_3 (GT_3) lequel ne se distingue pas du glycuconjugué de TA_3 . L'un et l'autre - ainsi que le montre le tableau 12 - ne peuvent être confondus par chromatographie dans ces deux solvants, avec les autres métabolites connus et possibles de T_3 . Ce dérivé de ST_3 est donc GT_3 ou GTA_3 . Or, seule GT_3 apparaît dans les produits marqués de l'excrétion biliaire d'animaux traités par $T_3(3'-^{131}I)$ (153, 158, 160). Il apparaît donc qu'on puisse identifier ce métabolite de ST_3 à GT_3 en dépit du fait que, dans nos conditions expérimentales la radioactivité revenant à celui-ci, n'ait pas été suffisante pour l'isoler et en analyser les produits de l'hydrolyse par la β -glycuconidase.

Nos recherches ayant été effectuées sur des rats thyroïdectomisés chirurgicalement, la présence de $GT_3(3'-^{131}I)$ dans la bile ne peut être attribuée à la formation endogène de $T_3(3'-^{131}I)$ à partir de $^{131}I^-$ provenant de la déshalogénéation de $ST_3(3'-^{131}I)$ injecté. En effet l'efficacité de l'exérèse thyroïdienne a été contrôlée en fin d'expérience par mesure post-mortem de la radioactivité du cou et du thymus. Il ne restait donc, chez ces animaux aucun tissu thyroïdien individualisé reliquat de la glande normale ou nodule ectopique. S'il existe une synthèse possible d'iodothyronine dans les tissus extra-thyroïdiens, hypothèse qui n'a jamais été démontrée, elle ne peut de toute manière aboutir qu'à la formation de traces infimes d'hormone marquée, inappréciables dans nos conditions expérimentales. La présence de GT_3 dans la bile de nos animaux injectés de ST_3 par voie veineuse ou duodénale suppose donc une hydrolyse préalable de la fonction ester avec libération de T_3 et conjugaison ultérieure de celui-ci avec l'acide glycuronique. Cette hydrolyse peut être réalisée par les sulfatases du foie ou celles des bactéries intestinales mais elle doit s'opérer lentement et n'être sans doute que partielle puisque - nous l'avons établi précédemment - ST_3 est un des constituants principaux du sang après administration de T_3 . L'absence de T_3 dans les échantillons de bile ou de sang analysés s'explique aisément : ST_3 lentement hydrolysé régénère T_3 de manière continue mais en quantité infime et peut être intra-cellulaire. Dès lors l'hormone est métabolisée au fur et à mesure, principalement par désioduration et glycuconjugaison, et seuls les produits de celles-ci se retrouvent en quantité appréciable dans les humeurs analysées. Cette explication est d'autant plus valable que l'on connaît la rapidité du catabolisme normal de l'hormone triiodée (5, 41, 56, 83, 105, 130, 223).

* *

*

Tableau 12

R_f des différents produits marqués dérivés possibles de ST₃(3'-¹³¹I) injecté; ils sont comparés à celui du métabolite biliaire principal (X) dans deux solvants : le n-butanol saturé par NH₄OH 2 N et la collidine-eau (100:35) en atmosphère NH₃.

R_f à 18°C

Produits	Solvants	
	n-BuOH sat. NH ₄ OH 2 N (descendant)	Collidine-eau (100,35) atm. NH ₃ (ascendant)
X	0,11	0,30
GT ₃ (153)	<u>0,13</u>	<u>0,28</u>
ST ₃	0,20	0,63
T ₃	0,65	0,70
GTA ₃ (176)	<u>0,12</u>	<u>0,30</u>
STA ₃	0,35	0,65
TA ₃	0,75	0,80
KT ₃ (158)	0,38	0,50
T ₂	0,51	0,58
TA ₂ (182)	0,64	-
3'-T ₁ (1)	0,41	0,58
3'-TA ₁ (1)	0,53	-
I ⁻	0,30	0,80

Liaison de ST₃ aux protéines

Nous avons tout d'abord mis en solution ST₃(3'-¹³¹I) préalablement desséché sous vide, dans du sérum de Rat à raison de 0,05 à 0,20

(1)

Roche J., Michel R., Nunez J., Jacquemin C., communication personnelle.

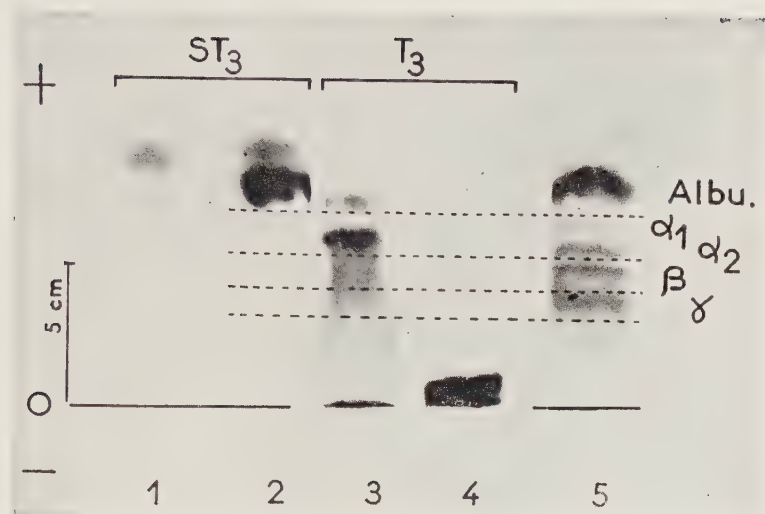


FIGURE 36.

Autoradiographie d'une électrophorèse sur papier en tampon véronal sodique, pH = 8,6 sous 120 V, pendant 15 heures :

- 1) De ST₃ ($3^{\cdot 131}\text{I}$) en solution aqueuse.
 - 2) De ST₃ ($3^{\cdot 131}\text{I}$) ajouté à du sérum.
 - 3) De T₃ ($3^{\cdot 131}\text{I}$) ajouté à du sérum.
 - 4) De T₃ ($3^{\cdot 131}\text{I}$) en solution aqueuse.
 - 5) Séparation électrophorétique dans les mêmes conditions que précédemment, des fractions protéiques du sérum de rat utilisé. Révélation au « noir-amide ».
- O = origine; Alb. = albumines; α , β , γ = globulines.

μg par ml. Après incubation d'une heure, les protéines ont été précipitées par l'acide trichloracétique à 10 % puis centrifugées et le surnageant prélevé. Le culot de centrifugation a été lavé à trois reprises par la solution acide utilisée pour la précipitation, et ces liquides de lavage ont été additionnés au premier surnageant. Dans ces conditions, on observe que 80 à 90 % de la radioactivité se retrouve dans le précipité. ST_3 précipite donc avec les protéines par l'acide trichloracétique et il y avait lieu de se demander s'il s'agissait d'une insolubilisation du produit en milieu acide, d'une adsorption de celui-ci sur les protéines dénaturées ou encore d'une liaison de la molécule aux protéines sériques comme il en existe avec les hormones thyroïdiennes et certains de leurs dérivés (99, 112, 131, 141). Dans cette dernière hypothèse il était évidemment intéressant de préciser quelle était la fraction protéique en cause. Dans ce but, nous avons mis en solution $\text{ST}_3(3' \text{-}^{131}\text{I})$ à l'état sec dans du sérum de rats thyroïdectomisés à la concentration de $0,05 \mu\text{g}$ par ml et réalisé une opération strictement semblable avec $\text{T}_3(3' \text{-}^{131}\text{I})$. Les milieux ont été fractionnés simultanément après une incubation de trois heures à température ambiante, par électrophorèse sur papier de Schleicher-Schüll en tampon véronal sodique de $\text{pH} = 8,6$ avec tension de 120 Volts pendant quinze heures. Ce fractionnement a été effectué avec comme corps de référence les deux molécules marquées en solution aqueuse de même concentration à $\text{pH} = 9$ et du sérum brut de Rat thyroïdectomisé. L'ionophorégramme a été révélé par autoradiographie (Fig. 36, 1, 2, 3, 4) suivie d'une mise en évidence des fractions protéiques par coloration au moyen du "noir-amide" (Fig. 36, 5). Ces documents montrent une différence essentielle entre le comportement de T_3 et celui de ST_3 vis-à-vis des protéines sériques : le premier est transporté principalement par une fraction comprise entre les α_1 et α_2 globulines alors que le second l'est uniquement par les albumines.

Discussion. Intentionnellement, nous nous sommes placés pour cette étude *in vitro* dans des conditions de concentration ($0,05 \mu\text{g}$ par ml) voisines de celles réalisées *in vivo* (injection veineuse de $0,6 \mu\text{g}$ de ST_3 ou de T_3 par 100 g de poids). En effet on sait que l'espace sodium du Rat est environ de 25 % (120). Si on postule que ST_3 et T_3 se distribuent également dans le sang et les liquides extra-cellulaires, on peut admettre qu'une injection de $0,6 \mu\text{g}$ par 100 g réalise, dans les premiers temps, une concentration humorale maximale d'environ $0,2 \mu\text{g}$ par ml. Nos recherches sur le métabolisme comparé de ST_3 et de T_3 étant effectué sur des animaux thyroïdoprives, nous avons utilisé pour nos essais *in vitro* du sérum d'animaux semblables. On sait en effet que la thyroïdectomie entraîne non seulement une chute du taux d'hormone circulante et par conséquent une moindre saturation de la protéine transporteuse de celle-ci, mais également qu'elle est susceptible d'altérer la composition protéinique du sérum (49, 114, 122, 141).

Notre étude montre que ST_3 est transporté exclusivement par les albumines mais qu'à la concentration utilisée et en présence de sérum de Rat hypothyroïdien, ce taux dépasse les capacités de liaison des albumines avec la molécule puisqu'une partie de ST_3 se retrouve sur l'électrophorégramme au delà de celles-ci. Cette fraction est peut-être libre car elle se situe exactement au même endroit que le témoin

ST₃ en solution aqueuse et qu'à ce niveau le "noir-amide" ne donne aucune coloration. Quant à T₃ elle est transportée principalement par une fraction protéinique comprise entre les α_1 et α_2 globulines (31, 77, 141) et qui est probablement une α_2 glycoprotéine particulière (76, 77, 139, 191). On sait que T₄ se lie également à une préalbumine indistincte des globulines dans nos conditions d'électrophorèse, mais que cette protéine ne fixe pas T₃ (77, 137, 141). Dans notre essai la quantité de T₃ ajoutée au sérum dépassait le taux de saturation de cette fraction protéique ce qui expliquerait, dans ces conditions, la liaison d'une partie de l'hormone avec les β globulines et les albumines : observation rapportée déjà antérieurement (6, 31, 77, 141). Il existe donc une différence essentielle entre les protéines qui assurent le transport de T₃ et celui de ST₃. Cette constatation permet d'envisager qu'il existe également une stabilité de liaison différente. Ces deux molécules se différencient en effet au niveau de la fonction phénol laquelle, on le sait, joue un rôle important dans la liaison aux protéines (3, 98, 140, 141) et par ailleurs la fonction protéique en cause est différente dans les deux cas. S'il en est ainsi, il peut donc en résulter dans l'organisme une vitesse de diffusion inégale pour les deux molécules.

Conclusions. ST₃ ainsi que T₃ ne circulent pas libres dans l'organisme mais liés aux protéines sériques. T₃ dans des conditions normales est transporté par une fraction protéique comprise entre les α_1 et α_2 globulines mais lorsqu'on augmente le taux de l'hormone, elle se lie également aux β globulines et aux albumines. Nous avons établi que ST₃ s'en distingue par le fait qu'il est lié exclusivement aux albumines et qu'il reste libre, lorsque celles-ci sont saturées.

Résumé

Dans la bile du Rat thyroïdectomisé injecté de ST₃(3'-¹³¹I) par voie veineuse (0,6 μ g/100 g) ou par voie duodénale (2 μ g/100 g) nous avons identifié par chromatographie dans deux solvants, le glycuconjugué de T₃(3'-¹³¹I) précédemment caractérisé dans les métabolites biliaires de T₃. Nous avons observé son apparition précoce et son taux croissant pouvant atteindre 50 % de la radioactivité sécrétée entre la dixième et la vingtième heure. La présence de GT₃ dans la bile de ces animaux suppose une hydrolyse préalable de la fonction ester de ST₃. Dans le plasma, à côté de traces de ¹³¹I⁻ on note la présence d'un métabolite non identifié mais existant en petites quantités du moins dans les premières heures après le traitement. Dans le chapitre précédent, nous avons montré par analyse électrophorétique des humeurs que ST₃(3'-¹³¹I) est métabolisé principalement par désioduration de la position 3'. Il résulte donc de l'ensemble de ces observations que ST₃ est utilisé par l'organisme et que deux étapes de ce métabolisme sont la déshalogénéation et l'hydrolyse de la fonction ester.

Par ailleurs, nous avons établi que ST₃, de même que T₃, se lie aux protéines mais que les protéines transporteuses sont différentes dans l'un et l'autre cas. Nous avons précisé que ST₃ se lie exclusivement aux albumines et que le taux de saturation de celles-ci dépassé, il reste apparemment libre dans le sérum.

CHAPITRE III

Distribution tissulaire comparée de ST_3 et de T_3 administrés par voie veineuse

Nous avons montré que l'excrétion radioactive, urinaire et fécale, était semblable dans nos conditions expérimentales, chez les animaux traités par ST_3 et T_3 marqués en $3'$ par ^{131}I . Ainsi donc, dans les deux cas, peu de temps après le traitement, une même radioactivité est retenue par l'organisme, et il était donc permis d'envisager la comparaison de la distribution tissulaire de la radioactivité injectée dans les deux groupes d'animaux.

Dans le présent chapitre, nous avons comparé la distribution tissulaire de la radioactivité dans un bref délai après injection veineuse de $ST_3(3'-^{131}I)$ et de $T_3(3'-^{131}I)$. Dans ces conditions, les résultats obtenus pouvaient nous renseigner sur la diffusion extravasculaire et sur la pénétration intra-tissulaire de ST_3 par rapport à celle de l'hormone dont il dérive.

Mode opératoire

On administre par voie veineuse à quinze rats thyroïdectomisés, $0,6 \mu g$ de $ST_3(3'-^{131}I)$ par $100 g$ de poids corporel. Les animaux préalablement héparinés, sont sacrifiés par section des vaisseaux de la base du cou, par groupes de trois après 5, 20, 60, 180 et 360 minutes. A titre comparatif, on administre de la même manière une dose semblable de $T_3(3'-^{131}I)$ à douze rats thyroïdectomisés qui sont sacrifiés par groupe de trois après 5, 20, 60 et 180 minutes. Dans l'expérience avec ST_3 , le sang, le foie, la rate, les reins, les poumons, le coeur et les surrénales ainsi que des fragments importants d'intestin grêle avec son contenu et une partie des muscles de la cuisse ont été prélevés. Dans celle avec T_3 , le sang, le foie, les reins et les muscles cruraux seuls ont été étudiés, des travaux antérieurs ayant précisé le comportement de l'hormone vis-à-vis des autres tissus de l'organisme.

Le sang est recueilli dans des tubes héparinés puis le plasma séparé par centrifugation est prélevé pour la mesure de sa radioactivité. Les organes en entier sont pesés frais et introduits en totalité ou par fragments de deux grammes environ, (soit un volume approximatif de $2 ml$) dans des tubes pour mesure de la radioactivité au compteur à scintillation avec cristal creux. Celle-ci, dans le cas du foie, est effectuée sur environ deux grammes de l'organe préalablement homogénéisé. Ces mesures de radioactivité sont rapportées à une partie aliquote de la solution injectée amenée au même volume que les échantillons et passée au compteur simultanément à eux. Les résultats obtenus nous ont permis d'établir pour chaque prélèvement :

1°) le pourcentage de la dose totale injectée contenue dans l'organe entier (sauf pour le tube digestif) : valeur R' . La masse musculaire totale a été évaluée pour ce calcul, à 45 % du poids du corps et le volume plasmatique total établi par la formule : plasma total en gramme = $0,122 \times (\text{poids corporel en g})^{0,778}$ (107).

2°) la valeur du rapport

$$\frac{{}^{131}\text{I}/\text{mg de tissu}}{{}^{131}\text{I}/\text{mg de plasma}} = R_I \text{ (espace } T_3 \text{ ou } ST_3),$$

lequel sera comparé à l'espace sodium R_{Na} du tissu considéré⁽¹⁾ et obtenu de même :

$$R_{Na} = \frac{{}^{24}\text{NaCl}/\text{mg de tissu}}{{}^{24}\text{NaCl}/\text{mg de plasma}}$$

3°) les valeurs moyennes de R' et R_I pour les divers tissus des trois animaux sacrifiés au même temps dans chacun des deux groupes.

Résultats

Les résultats des deux séries expérimentales sont illustrés par les figures 37, 38 et le tableau 13. Ils montrent essentiellement que chez les animaux traités par $ST_3(3'-{}^{131}\text{I})$ de même que chez ceux injectés de $T_3(3'-{}^{131}\text{I})$, la plus grande partie de la radioactivité injectée se retrouve dans les premières heures dans le sang, le foie, les muscles et les reins. Notre étude concerne donc principalement ces divers tissus dont nous présenterons séparément les résultats. Ceux-ci représentent des valeurs moyennes pour lesquelles l'erreur quadratique moyenne a été calculée. Les différences observées entre les résultats des deux groupes expérimentaux ont été considérées significatives pour une probabilité $P < 0,02$ par le test des "t" de Student (42).

Plasma. Le graphique (Fig. 37) donne les valeurs moyennes de la radioactivité plasmatique totale en pour-cents de la dose administrée (ordonnées) et en fonction du temps (abscisses) après injection de $ST_3(3'-{}^{131}\text{I})$ et de $T_3(3'-{}^{131}\text{I})$. On remarque une décroissance beaucoup plus rapide de la radioactivité après traitement par T_3 . Or dans ce cas, on sait qu'au cours des premières heures après le traitement, la radioactivité plasmatique revient principalement à la molécule injectée (57), d'autre part, nous avons établi qu'il en était de même chez les animaux traités par ST_3 . Par ailleurs, l'étude statistique des résultats comparés montre que les différences observées sont significatives. La dissociation des deux courbes indique donc bien une vitesse de diffusion extravasculaire très inégale des deux molécules. Le passage de ST_3 du sang vers les espaces extracellulaires s'effectue donc beaucoup plus lentement que celui de T_3 et il est permis d'envisager

(1) Roche J., Michel R., Jouan P. : communication personnelle.

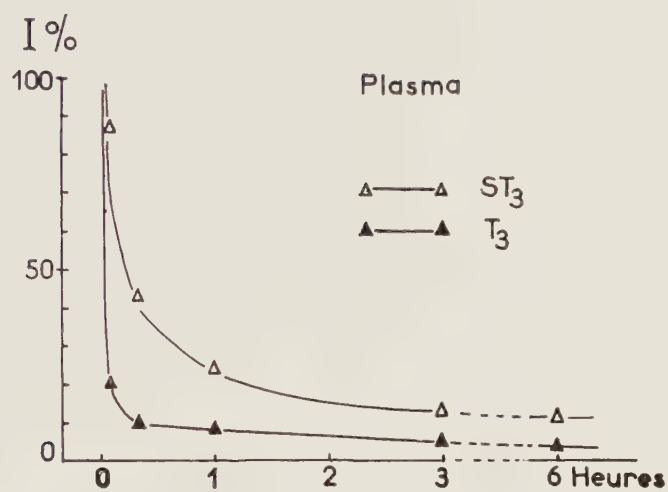


FIGURE 37.

^{131}I dans le plasma total en fonction du temps et exprimé en pourcents de la radio-activité injectée, après administration veineuse de T_3 ($3 \cdot ^{131}\text{I}$) et après celle de son ester sulfurique marqué de même ($0,6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$).

que cette diffusion plus lente de l'ester sulfurique soit en rapport avec une stabilité plus grande de sa liaison avec les protéines.

Foie. La radioactivité totale (R') du parenchyme hépatique inclut non seulement celle localisée dans le tissu proprement dit mais également celle de la bile des canalicules biliaires. Nous avons montré que dans les premières heures du moins, l'excrétion radioactive biliaire était quantitativement semblable chez les animaux des deux groupes. En conséquence on peut admettre que les différences observées entre les valeurs de R' dans les deux séries expérimentales résultent non pas de ce facteur mais du comportement différent du foie vis-à-vis des deux molécules étudiées. Aux divers temps envisagés, R' est toujours plus important chez les animaux traités par T_3 (Fig. 38) et atteint son maximum après quelques minutes. Cette différence n'est cependant importante et statistiquement valable que cinq minutes après le traitement. Si on considère les valeurs correspondantes de l'espace $T_3(R_I)$ on note qu'elles sont très élevées dès les premières minutes qui suivent l'injection de l'hormone alors que l'espace ST_3 est relativement faible à tous moments. Il reste dans tous les cas inférieur à l'unité alors que l'espace T_3 , dès cinq minutes après l'injection atteint une valeur de deux et après vingt minutes une valeur de trois. Le foie concentre donc T_3 rapidement et d'une manière importante, mais nous n'avons pas observé de concentration de l'ester sulfurique correspondant. Les différences observées entre l'espace ST_3 et l'espace T_3 sont toutes dans le même sens et sont significatives. Or, nous l'avons déjà signalé, dans un délai court après le traitement, le constituant radioactif principal du plasma est dans l'un et l'autre cas le produit injecté. Dans ces conditions, les valeurs de R_I mesurent bien l'aire de diffusion de ST_3 et de T_3 dans le tissu hépatique. A partir de vingt minutes la radioactivité totale du foie des animaux des deux groupes est assez semblable alors qu'il existe une différence considérable entre l'espace T_3 et celui de ST_3 : la radioactivité plasmatique très supérieure chez les rats traités par ST_3 compense ici la faible diffusion hépatique du produit.

Muscles. Dans les deux expériences la radioactivité musculaire totale est semblable (Fig. 38). Les valeurs de l'espace T_3 dans ce tissu sont toujours très inférieures à l'unité mais après une heure atteignent puis dépassent la valeur de l'espace sodium témoignant peut-être de la pénétration cellulaire de l'hormone. Par contre les valeurs de l'espace musculaire de ST_3 sont toujours inférieures à celles de l'espace T_3 et ces différences sont significatives du moins dans la première heure. En conclusion, les muscles ne concentrent ni l'hormone ni son ester sulfurique et l'aire de diffusion de ST_3 est inférieure à celle de T_3 .

Reins. L'analyse des résultats obtenus avec les reins est complexe du fait que cet organe concentre d'une manière importante les iodures. La radioactivité totale de l'organe est pour une part importante due à ces derniers. Dans les premières minutes néanmoins, le taux de déshalogénéation du produit injecté est nécessairement très faible et dès

lors à ce moment, on peut négliger le facteur "iodure" dans l'interprétation des résultats. Par après, dans nos conditions expérimentales, nous avons noté une déshalogénéation pratiquement semblable de $ST_3(3'-^{131}I)$ et de $T_3(3'-^{131}I)$. Après ce délai, l'intervention du facteur "iodure" peut donc être considérée comme de même importance dans les deux groupes et ceci permet d'en comparer les résultats et d'attribuer les différences observées au comportement dissemblable des produits injectés vis-à-vis de ce tissu. Cinq minutes après le traitement, la radioactivité totale des reins chez les animaux traités par ST_3 est très inférieure à celle observée chez ceux injectés de T_3 (Fig. 38). A ce moment, l'espace rénal de ST_3 est très faible par rapport à l'espace sodium alors que l'espace T_3 atteint l'unité. Les différences respectives entre R' et R_1 dans les deux groupes sont significatives or, à ce moment, on peut négliger, comme nous l'avons signalé, le facteur "iodure". La diffusion de T_3 dans le parenchyme rénal est donc très rapide mais il n'en est pas de même pour celle de ST_3 . Après vingt et soixante minutes, la radioactivité totale des reins est semblable dans les deux groupes d'animaux mais il existe une différence importante entre les valeurs de l'espace ST_3 et de l'espace T_3 , différence que nous ne pouvons expliquer par le facteur "iodure".

Ces résultats conduisent à la même conclusion que précédemment concernant la diffusion comparée des deux produits. Les résultats, après trois heures, paraissent cependant contradictoires avec les précédents : l'espace T_3 et l'espace ST_3 sont voisins et la radioactivité totale des reins dans le groupe ST_3 est supérieure à celle du groupe T_3 . Nous pensons pouvoir expliquer ces résultats en considérant qu'à ce moment une quantité non négligeable de l'ester sulfurique a été hydrolysée avec libération de T_3 .

Autres organes. Chez les animaux traités par $ST_3(3'-^{131}I)$ divers autres organes ont été aussi étudiés. La radioactivité contenue dans ceux-ci par rapport à celle administrée, est extrêmement faible à l'exception du tube digestif renfermant les produits de la sécrétion biliaire. Le tableau 13 rassemble les valeurs de l'espace ST_3 pour ces différents tissus et montre qu'à l'exception de l'intestin grêle avec son contenu, ces valeurs sont toujours inférieures à l'espace sodium pour le poumon, le coeur et les surrénales et la rate. Dans le cas des surrénales, il est important de signaler le comportement différent de T_3 . Chez le Lapin et la Souris, il a en effet été établi antérieurement que les surrénales concentrent précocement l'hormone triiodée (56).

*

*

*

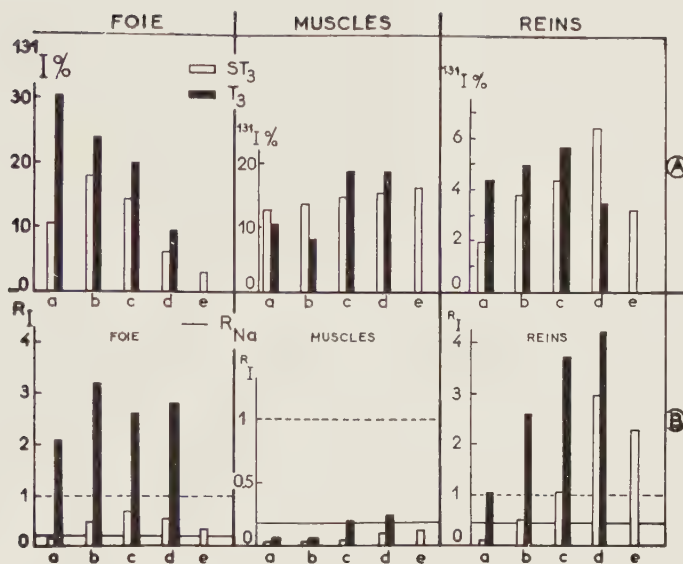


FIGURE 38.

A. Radioactivité totale (R') du foie, des muscles et des reins, exprimée en pourcents de la dose administrée et mesurée à des temps différents après l'injection veineuse aux rats de ST_3 ($3'^{131}I$) — colonnes blanches — et après l'administration de T_3 ($3'^{131}I$) — colonnes noires — à la dose de $0,6 \mu g/100 g$.

B. Valeurs de $R_I = \frac{^{131}I/mg \text{ plasma}}{^{131}I/mg \text{ tissu}}$ — pour les mêmes organes, dans des conditions expérimentales identiques.

(A titre comparatif, la valeur de l'espace sodium des tissus considérés est indiquée par le trait plein horizontal.)

Moment de la mesure par rapport à l'injection : a = après 5 minutes; b = après 20 minutes; c = après 60 minutes; d = après 180 minutes; e = après 360 minutes.

Tableau 13

Valeurs moyennes de

$$R_I = \frac{^{131}\text{I}/\text{mg de tissu}}{^{131}\text{I}/\text{mg de plasma}}$$

à différents temps après l'injection veineuse de $\text{ST}_3(^{131}\text{I})$,
et affectées des erreurs quadratiques moyennes correspondantes.

$$[R_{\text{Na}} = \frac{^{24}\text{NaCl}/\text{mg de tissu}}{^{24}\text{NaCl}/\text{mg de plasma}} = \text{espace sodium du tissu considéré du Rat.}]$$

R_I après injection veineuse de $(^{131}\text{I})\text{ST}_3$

Temps en minutes	Intestin grêle avec son contenu	Poumons	Coeur	Surrénales	Rate
5	0,03 ± 0,004	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,01
20	0,22 ± 0,04	0,42 ± 0,11	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,12 ± 0,01
60	0,48 ± 0,20	0,34 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,07	0,12 ± 0,01
180	1,27 ± 0,40	0,27 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,10	0,18 ± 0,04
360	0,86 ± 0,20	0,45 ± 0,07	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,09	0,15 ± 0,03
R_{Na}	0,35		0,36	0,48	

Discussion

Les résultats obtenus concernant la distribution de la radioactivité après injection veineuse de $\text{ST}_3(^{131}\text{I})$ et T_3 marquée de même, peuvent être comparés dans le but d'en tirer des conclusions sur le comportement de ces deux produits dans l'organisme. En effet, d'une part comme nous l'avons déjà signalé, l'excrétion étant la même dans

les deux groupes peu de temps après le traitement, nous comparons les tissus d'animaux ayant reçu et ayant effectivement conservé la même quantité de produit marqué. D'autre part, celle-ci a été modifiée de manière semblable chez les rats traités par ST_3 , et chez ceux injectés de T_3 , puisque nous avons établi que la désioduration biologique de ces deux molécules était de même importance.

Par ailleurs, dans un délai court après l'injection de $ST_3(3'-^{131}I)$ nous avons montré que pratiquement toute la radioactivité sanguine revenait à la molécule administrée, et nous savons qu'il en est de même chez l'animal traité par $T_3(3'-^{131}I)$ (57). Ultérieurement, il n'en est plus de même, une partie notable du produit étant métabolisée et dès lors, une étude semblable à celle que nous avons réalisée, ne pourrait nous renseigner sur l'utilisation comparée de T_3 et de ST_3 par le tissu, puisque à ce moment le sang leur amène non plus ces produits, mais l'ensemble de leurs métabolites.

Le fait principal établi par nos recherches est la diffusion très lente de ST_3 . Elle a été démontrée non seulement par l'étude de la radioactivité plasmatique en fonction du temps après l'injection, mais également par celle de la radioactivité des organes en particulier le foie, les reins et les muscles. Cette diffusion lente de ST_3 , résulte peut-être de l'intensité de sa liaison avec les albumines transporteuses. On sait en effet que la stabilité de cette liaison entre les analogues structuraux de la thyroxine et les protéines, dépend de la constitution du dérivé. Dans celui-ci l'OH phénolique, le nombre et la position des atomes d'iode, entre autres, jouent un rôle important (3, 98, 140) et on peut admettre qu'il en soit de même de la protéine en cause. La diffusibilité de T_3 par exemple, est beaucoup plus rapide que celle de T_4 (5, 41, 156) : ce fait a été expliqué par la labilité différente de leur liaison respective avec les protéines et en effet, on a démontré que l'intensité de la liaison de T_3 était trois fois moindre que celle de T_4 (5, 25, 41, 138, 156). Dans le cas qui nous occupe il s'agit non seulement de deux molécules distinctes au niveau de l'OH phénolique, mais encore de protéines transporteuses différentes. Nos observations ne permettent pas d'affirmer que l'ester sulfurique soit concentré dans un organe quelconque à l'exception peut-être du rein mais dans ce cas l'interférence des iodures provenant de sa déshalogénéation n'autorise pas, pensons-nous, une conclusion formelle. T_3 par contre est concentré par le foie, les reins et les surrénales, précocement et de manière importante.

L'espace ST_3 dans tous les tissus, est toujours très inférieur à celui de T_3 , témoignant de la diffusion lente de l'ester dans le liquide interstitiel et probablement dans les cellules. Nous nous sommes alors posé la question de savoir si nos résultats permettaient d'affirmer ou non la pénétration cellulaire de ST_3 . On constate en effet que les valeurs de R_I pour ST_3 sont toujours inférieures ou légèrement supérieures à celles de R_{Na} en ce qui concerne le foie et les muscles, et qu'il en est de même pour les reins dans la première heure, ce qui pourrait signifier que l'aire de distribution de cette molécule est inférieure à l'espace extracellulaire.

Ces résultats en fait n'autorisent aucune conclusion. La comparaison entre R_I et R_{Na} serait interprétable pour autant que le produit injecté possède la même concentration dans le plasma et dans le liquide interstitiel tissulaire. Dans ce cas une valeur de R_I supérieure à R_{Na} signifierait une pénétration cellulaire de la molécule puisque R_{Na} mesure l'espace extracellulaire. Pour $R_I = R_{Na}$, on serait autorisé à affirmer que la molécule ne pénètre pas dans les cellules, mais se répartit également dans le plasma et le liquide intercellulaire. Compte tenu de cette hypothèse, le raisonnement précédent serait valable. L'hypothèse à la base de celui-ci est probablement fausse ainsi qu'il fallait s'y attendre, sachant que la composition protéique de la lymphe est différente qualitativement et quantitativement de celle du plasma (92, 135, 188, 193) et que ces protéines sont indispensables au transport de ST_3 . Les rares travaux (188) comparant le taux de l'iode hormonal dans le plasma et la lymphe, montrent des différences importantes et variables suivant le réseau lymphatique considéré, ce qui confirme notre réfutation.

Nos résultats ne nous permettent donc pas de préciser si ST_3 pénètre dans les cellules, non plus que d'affirmer qu'il se distribue exclusivement à l'espace extracellulaire. Cependant ST_3 est désiodé or on sait que ce processus est enzymatique intracellulaire (194, 196) et qu'il s'opère principalement dans le parenchyme hépatique (38, 39, 40, 41, 110). Par ailleurs ST_3 est en partie hydrolysé avec libération de T_3 et formation de GT_3 . Cette hydrolyse peut être réalisée par les arylsulfatases du foie, or la glycuconjugaison s'opère surtout dans cet organe (16, 204, 205). Ces faits nous amènent à conclure que ST_3 pénètre au moins dans les cellules hépatiques et que c'est dans celles-ci principalement, que s'effectuent les étapes connues de son métabolisme. En conclusion ST_3 ne peut pas être considéré comme une forme active ou de transport de l'hormone. Il n'apparaît pas davantage comme un produit de détoxification au sens classique du terme, car il n'est pas excrété préférentiellement à son précurseur hormonal et par ailleurs est en partie utilisé par l'organisme. Nous pensons que ST_3 constitue une réserve, entre autre, sanguine d'hormone et que son utilisation dépend du tissu hépatique.

Résumé

Nous avons étudié la distribution tissulaire comparée de la radioactivité au cours des premières heures après l'injection veineuse de $ST_3(3'-^{131}I)$ et de $T_3(3'-^{131}I)$ ($0,6 \mu g/100 g$). Ces recherches effectuées peu de temps après le traitement c'est-à-dire à un moment où le catabolisme du produit injecté peut être considéré comme négligeable, nous ont autorisé à certaines conclusions. Par l'étude du plasma et par la détermination de l'espace ST_3 comparé à l'espace T_3 dans différents organes, nous avons montré que ST_3 a une diffusion extravasculaire beaucoup plus lente que son précurseur. Aucun tissu ne concentre ST_3 à l'exception peut-être du rein alors que l'hormone correspondante est concentrée rapidement et de manière importante par le foie et les reins principalement.

L'espace ST_3 dans les muscles, les poumons, le coeur, les sur-rénales et la rate est toujours très inférieur à celui de son précurseur hormonal. L'ensemble de ces résultats nous autorise à considérer que ST_3 n'est pas une forme active ou une forme de transport de l'hormone thyroïdienne ni un produit de détoxication mais constitue une réserve sanguine en précurseur de T_3 .

*

*

*

CHAPITRE IV

Excrétion et distribution tissulaire comparées de ST_3 et de T_3 , injectés dans le duodénum

Après son injection veineuse ST_3 est excrété principalement par la bile. Dans des conditions expérimentales semblables, l'excrétion biliaire de T_3 est plus importante or, dans les deux cas, l'élimination fécale des premiers jours est de même importance. Ceci laisse supposer une résorption intestinale différente des deux produits. C'est à l'étude de cette question qu'est réservée cette partie de notre travail. Nous avons tout d'abord cherché à préciser dans quelle mesure ST_3 était résorbé par le tube digestif et ensuite nous avons comparé cette résorption et l'excrétion urinaire à laquelle elle donne lieu, à celles de T_3 .

EXPERIENCE I

Mode opératoire

Nos recherches ont porté sur six rats mâles de 150-200 g, thyroïdectomisés de trois semaines et maintenus à 24°C, porteurs d'une dérivation biliaire à la peau réalisée comme décrit précédemment. La bile a été recueillie dans un bissac en verre fixé au dos de l'animal lui-même placé dans une cage permettant la récolte séparée des urines et des fèces. Les animaux, par groupes de deux, ont reçu par voie duodénale (laparotomie et injection dans la troisième portion du duodénum et par 100 g de poids corporel, de 0,2, 0,5 et 2,5 μg de $ST_3(3'-^{131}\text{I})$ d'une radioactivité spécifique de 1 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$. La solution aqueuse de pH = 9 était de 1 $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$, la pureté du produit a été vérifiée par chromatographie et sa teneur en iodure (1,5 %) établie par électrophorèse. La bile, les urines et les fèces ont été recueillis et les animaux sacrifiés 24 heures après le traitement. Divers organes prélevés en totalité et la carcasse avec les muscles, ont été solubilisés - à l'exception du tissu osseux - par la lessive de soude à l'ébullition. La radioactivité des gels ainsi obtenus, mesurée au moyen d'un compteur à scintillation avec cristal creux, sur totalité ou partie aliquote des prélèvements, a été exprimée en pourcentage de celle injectée et mesurée de même.

Résultats

Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau 14 et montrent que la radioactivité totale effectivement retrouvée dans

chaque cas a été de 69 à 91 %. Le bilan de distribution de celle-ci a été établi en pour-cents à partir de cette valeur. Après 24 heures on voit que 20 à 30 % de $ST_3(3'-^{131}I)$ injecté dans le duodénum ont été résorbés puis en partie excrétés par la bile et l'urine. Un échantillon de bile des deux premières heures après le traitement par 2,5 µg de ST_3 (rats n° 5 et 6) a été analysé par chromatographie et a révélé la présence de trois constituants radioactifs : ST_3 (70 %), GT_3 (15 %) et iodures (5 %). Ces résultats sont repris ici pour mémoire, ayant été exposés au chapitre II. L'étude électrophorétique des urines de 24 heures des rats n° 2 et 6 a mis en évidence dans celles-ci respectivement 85 et 65 % de ^{131}I à l'état d'iodures.

La résorption intestinale de ST_3 ne semble pas quantitativement modifiée lorsqu'on injecte 0,2 µg ou une dose dix fois supérieure.

Tableau 14

Excrétion des 24 heures et distribution tissulaire de la radioactivité à la 24ème heure, après injection duodénale de $ST_3(3'-^{131}I)$ à dose variable.

ST_3 : dose injectée par 100 g	0,2 µg		0,5 µg		2,5 µg	
Rats thyroïdectomisés	1	2	3	4	5	6
Radioactivité totale retrouvée en % de la dose	91	84	88	69	80	87
Distribution de la radioactivité en % :						
Intestins + fèces	73	67	84	70	72	74
Bile	6,7	7	1,6	5,7	7,5	9
Urine	1	4	1,4	7,7	2,9	2,2
Plasma (1 ml)	1,9	2	0,2	0,2	0,3	0,5
Muscle + squelette	4,2	6	6,9	3,8	3,5	2,5
Foie	2,3	2,1	0,7	0,5	0,7	0,9
Reins	0,8	0,4	0,4	0,1	0,6	0,5
Peau + organes restants	10,1	11,5	4,8	12	12,5	10,4

EXPERIENCE II

Cette expérience a été menée sur dix rats thyroïdectomisés de 160-190 g : six d'entre eux ont reçu 0,25 µg de $ST_3(3'-^{131}I)$ (1 µC/µg) en deux injections duodénales à quatre heures d'intervalle et les autres ont été traités de même par 0,3 µg de $T_3(3'-^{131}I)$ (0,7 µC/µg). Les produits en solution aqueuse à pH = 9 de 0,5 µg par 0,1 ml, renfermaient moins de 2 % d'iodure. Les urines et les fèces ont été récoltées pendant trois jours, leur radioactivité a été mesurée et leur teneur en radioiodures évaluée. Pour ce faire, à un volume déterminé d'urine, on ajoute un volume égal de plasma de rats non traités et les protéines ont été précipitées par l'acide trichloracétique à 10 % (112, 131, 141). Le culot de centrifugation est lavé deux fois par cet acide et la radioactivité des liquides surnageants est mesurée de même que celle des protéines précipitées. Dans le cas des matières fécales, on a procédé comme suit : 100-300 mg sont mis en suspension dans l'eau et additionnés d'un volume égal de plasma de rats; les protéines sont ensuite précipitées, lavées et la radioactivité mesurée comme dans le cas des urines. Des témoins ont été effectués à partir d'urine et de fèces additionnés de $ST_3(3'-^{131}I)$ (0,01 µg/1 ml d'urine ou de fèces en suspension) et de ^{131}INa traceur (Tableau 15).

Résultats

Chez les animaux du groupe ST_3 la radioactivité totale effectivement retrouvée était de 81 à 89 % (moyenne 87) et chez ceux du groupe T_3 de 79 à 109 % (moyenne 99) de la dose totale administrée. La différence entre ces deux moyennes n'étant pas significative, les résultats de ces deux groupes sont donc comparables. Ils figurent dans le tableau 15.

L'excrétion fécale dans les deux groupes est semblable et la radioactivité éliminée par cette voie revient exclusivement à des produits précipités par l'acide trichloracétique après addition de protéines (P.T.C.).

Chez les animaux traités par ST_3 et chez ceux injectés de T_3 , après trois jours, la même fraction de la dose injectée demeure donc dans l'organisme et cette constatation simplifie l'étude de la distribution comparée de celle-ci.

L'excrétion urinaire pendant le même temps est beaucoup plus importante de même que rapide (tableau 17) chez les animaux du groupe T_3 , et cette différence est très significative. Dans les deux groupes la radioactivité urinaire est soluble dans l'acide trichloracétique (S.T.C.) après addition préalable de protéine : elle revient donc essentiellement aux iodures. Ils rendent compte de la déshalogénation du produit résorbé par l'intestin.

Dans l'intestin des animaux injectés de ST_3 , on a retrouvé 16,7 % de la dose injectée alors que chez ceux traités par T_3 la fraction

restante est de 0,8 %. Il semble donc que la résorption intestinale de ST_3 soit nettement inférieure à celle de T_3 . On peut en effet calculer que la résorption de l'hormone est de 41 % alors qu'elle n'est que de 27 % pour son ester sulfurique. Quant à la répartition de cette fraction résorbée, on note que dans le groupe ST_3 la radioactivité retrouvée dans la peau d'une part, les muscles et le squelette d'autre part, est nettement supérieure aux valeurs correspondantes observées dans le groupe T_3 . Cette différence peut s'expliquer par la résorption plus lente de ST_3 qui, de plus, séjourne plus longtemps que T_3 dans le sang. Par ailleurs dans cette expérience il est déshalogéné moins rapidement que l'hormone. On peut en effet évaluer à partir des données de l'excrétion urinaire que 50 % de la fraction résorbée de ST_3 ont été déshalogénés en trois jours alors que dans le même temps 80 % de celle de T_3 ont été désiodés et ce, principalement, au cours des 24 premières heures ainsi que le montre le tableau 17.

Tableau 15

Fraction de la radioactivité urinaire (1) et fécale (2) qui après addition de protéines plasmatiques reste soluble dans l'acide trichloracétique (S.T.C.) ou précipite par lui (P.T.C.), chez des animaux traités par injection duodénale de 0,25 μg $ST_3(3'-^{131}I)$ par 100 g et de 0,3 μg $T_3(3'-^{131}I)$ par 100 g ; (3) contrôles effectués.

	1		2		3		
Temps en heures	Urine S.T.C. en %		Fèces P.T.C. en %		Contrôles	% S.T.C.	% P.T.C.
	ST_3	T_3	ST_3	T_3	urine + $ST_3(3'-^{131}I)$	5	96
0 - 24	89	88	95	98	urine + ^{131}INa	95	4
24 - 48	80	79	92	94	fèces + $ST_3(3'-^{131}I)$	1	98
48 - 72	67	73	91	90	fèces + ^{131}INa	91	10

Tableau 16

Excrétion des trois jours et distribution tissulaire de la radioactivité au troisième jour, après injection duodénale de $ST_3(3'-^{131}I)$ et de $T_3(3'-^{131}I)$. Valeurs moyennes affectées de leur erreur quadratique et exprimées en pour-cents de la dose administrée. P : coefficient de probabilité d'après le test "t" de Student.

Traitement et nombre d'animaux	ST_3 0,25 $\mu g/100$ g (6 rats)	T_3 0,3 $\mu g/100$ g (4 rats)	Coefficient P
Radioactivité totale effectivement retrouvée	$87 \pm 2,6$	$99 \pm 7,1$	$0,1 \pm 0,05$
Répartition en % :			
Urine	$15,30 \pm 2,6$	$38,40 \pm 3,4$	$< 0,01$
Fèces	$56,20 \pm 8,7$	$58,10 \pm 2,6$	-
Tube digestif	$16,70 \pm 6,1$	$0,80 \pm 0,03$	$0,10 - 0,05$
Peau	$8,80 \pm 2,1$	$2,0 \pm 1,4$	$0,05 - 0,02$
Muscles et Squelette	$2,46 \pm 0,66$	$0,34 \pm 0,08$	$0,05 - 0,02$
Foie	$0,30 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,07$	-
Rein	$0,16 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,01$	$0,10 - 0,05$
Plasma (1 ml)	$0,08 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,003$	$> 0,10$
Fraction résorbée en 3 jours	$27 \pm 3,9$	$41 \pm 2,7$	$0,05 - 0,02$

Tableau 17

Excrétion radioactive urinaire fractionnée, après injection duodénale de $ST_3(3'-^{131}I)$ et de $T_3(3'-^{131}I)$. Valeurs moyennes affectées de leur erreur quadratique moyenne. P : coefficient de probabilité selon le test "t" de Student.

Temps en heures \ Traitement	ST_3 0,25 $\mu g/100$ g (6 rats)	T_3 0,3 $\mu g/100$ g (4 rats)	P
0 - 24	$4,3 \pm 1,6$	$26,2 \pm 2,3$	$0,05 - 0,02$
24 - 48	$6,8 \pm 1,5$	$5 \pm 0,3$	$> 0,10$
48 - 72	$4,2 \pm 1,4$	$7,2 \pm 1,7$	$> 0,10$

Discussion

Les expériences I et II indiquent nettement une résorption intestinale partielle de ST_3 ; dans l'une et l'autre, elle est de 20-30 % et ce pour des doses allant de 0,2 à 2,5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, administrés en une ou deux injections. Les produits éliminés par la bile après ce traitement sont constitués principalement par le produit injecté mais renferment dès les premières heures un taux appréciable de glycuconjugué de T_3 ce qui suppose une hydrolyse préalable de la fonction ester de ST_3 , mais ne nous permet pas de savoir si l'ester sulfurique a été résorbé tel que ou après hydrolyse préalable par les bactéries de l'intestin. Il faut cependant admettre que ST_3 est en partie résorbé sous cette forme pour expliquer dans l'expérience II la radioactivité retrouvée après trois jours dans les différents tissus étudiés et qui est dans tous les cas supérieure à celle observée chez les animaux du groupe T_3 . Dans l'hypothèse où ST_3 serait totalement hydrolysé préalablement à sa résorption intestinale, tel ne serait pas le cas et l'excrétion radioactive urinaire totale des deux groupes serait voisine. Dans cette expérience, la déshalogénation de ST_3 s'effectue plus lentement que celle de T_3 alors qu'après injection veineuse, les deux molécules semblent être désiodées de même (Chapitre I). Cette contradiction n'est qu'apparente car les deux expériences ne sont pas comparables : dans l'une l'entière du produit (0,6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) est distribuée immédiatement à la totalité de l'organisme, alors que dans l'autre, la résorption est lente et correspond en fait à une dose beaucoup plus faible (seule la fraction résorbée intervenant) et de plus, administrée par perfusion continue (résorption) pendant de nombreuses heures.

Résumé

Nous avons étudié l'excrétion et la répartition tissulaire de la radioactivité après injection intraduodénale de $ST_3(3'-^{131}\text{I})$ et de $T_3(3'-^{131}\text{I})$.

La résorption intestinale de ST_3 est inférieure à celle de T_3 mais est cependant notable (27 % en trois jours contre 41 % pour T_3). L'estérification de T_3 ne facilite donc que peu son élimination par cette voie et nous avons précédemment montré qu'il en était de même au point de vue de l'excrétion urinaire.

ST_3 est résorbé en partie tel que par la muqueuse intestinale ou en totalité car nos expériences n'ont pas démontré la nécessité de son hydrolyse préalable. La fraction ainsi résorbée est moins rapidement déshalogénée que celle des animaux traités de même par T_3 ce qui signifie que l'estérification sulfurique de l'hormone a pour effet d'en retarder le catabolisme.

CONCLUSIONS DE LA TROISIEME PARTIE

Nous avons étudié le métabolisme comparé de $ST_3(3'-^{131}I)$ et de $T_3(3'-^{131}I)$ chez le Rat thyroïdoprivé, après administration des produits à la dose de $0,6 \mu g/100 g$. Nous avons établi qu'administré par voie veineuse, ST_3 n'est pas excrété préférentiellement à T_3 son précurseur biologique ni par la voie urinaire ni par la voie fécale et que la radioactivité des urines revient essentiellement dans les deux groupes à $^{131}I^-$ alors que, celle des fèces appartient principalement à des dérivés organiques. Il en résulte que l'estérification sulfurique de T_3 ne facilite pas l'excrétion de l'hormone et que son produit est métabolisé dans l'organisme entre autre par déshalogénéation. Nous avons montré que, dans ces conditions, elle est quantitativement comparable à celle de T_3 , mais lui devient inférieure lorsque la posologie est plus physiologique (injection duodénale). L'estérification sulfurique de T_3 semble donc en retarder le catabolisme. L'excrétion radioactive biliaire chez les animaux traités par ST_3 semble, dans les premières heures, voisine de celle observée chez les rats injectés par T_3 ; ultérieurement elle devient moins importante. Dans les deux cas le taux des iodures est faible. Les produits de l'excrétion biliaire de ST_3 , peu de temps après le traitement, ne contiennent pratiquement que la molécule injectée; par la suite, un dérivé de celle-ci apparaît en quantité croissante et a été identifié au glycuroconjugué de T_3 . La formation de GT_3 dans ce cas suppose une hydrolyse préalable dans l'organisme de la fonction ester de ST_3 administré : une seconde voie métabolique de ce dernier a donc été précisée.

L'analyse du plasma chez les animaux traités par ST_3 révèle que celui-ci est le constituant principal accompagné de traces d'iodure et d'un composé qui n'a pas été identifié. Nous avons montré que ST_3 se lie aux protéines sériques et que la fraction en cause est l'albumine.

La diffusion extravasculaire de ST_3 , sans doute en raison de la stabilité plus grande de sa liaison aux albumines, est beaucoup plus lente que celle de T_3 liée aux α_2 globulines. Nous avons montré que le volume de diffusion de ST_3 dans le foie, les muscles et les reins (espace ST_3) est très inférieur à celui de T_3 . ST_3 n'est concentré de manière évidente par aucun organe, sa pénétration intracellulaire n'a pas été démontrée, mais elle est possible et on doit admettre qu'elle s'effectue au moins dans le tissu hépatique.

Nos observations permettent de penser que ST_3 en tant que tel, ne doit pas être biologiquement actif et qu'il ne constitue pas une forme de transport de l'hormone; elles indiquent que le foie joue dans son métabolisme un rôle principal.

La résorption intestinale de ST_3 est plus faible et plus lente que celle de T_3 mais n'est pas négligeable. ST_3 intervient donc dans la circulation entéro-hépatique de l'hormone. Nos expériences nous autorisent à penser que ST_3 est résorbé en grande partie sans hydrolyse bactérienne préalable mais l'intervention de celle-ci ne peut pas être écartée. Quoiqu'il en soit, la présence de ST_3 en proportion

importante dans le sang des animaux traités par T_3 , ainsi que les résultats des recherches rapportées ci-dessus, nous permettent de considérer que la sulfoconjugaison de l'hormone n'est pas un simple processus de détoxification mais réalise une réserve entre autre sanguine en précurseur de T_3 .

CONCLUSIONS GENERALES

Les travaux de ces dernières années ont accordé une importance particulière, dans la fonction thyroïdienne, à la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) substance hormonale, et à son dérivé naturel l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA_3), métabolite doué d'activités hormonales. Ces faits justifient nos recherches sur le métabolisme de ces corps.

Certaines étapes de leur métabolisme étaient connues : la déshalogénéation, la dégradation de la chaîne alanyle de T_3 (160, 173) et la glycuconjugaison de l'hormone de même que de son dérivé acétique (153, 176).

La conjugaison de ces substances avec l'acide glycuronique s'opère principalement dans le foie (205) mais est également possible dans les tissus extrahépatiques (16, 38, 39). La sulfoconjugaison pouvait être envisagée comme possible et probable (153, 181), en raison du groupe phénolique que possèdent T_3 et TA_3 . L'analyse chromatographique des produits radioactifs excrétés par la bile après administration de l'hormone triiodée et de son dérivé acétique marqués, avait révélé l'existence de métabolites non identifiés (156, 176). Il était raisonnable de considérer que parmi ceux-ci, existait peut-être le sulfoconjugué.

L'objet de notre travail a été de confirmer cette hypothèse et de préciser certains aspects de la conjugaison des hormones thyroïdiennes avec l'acide sulfurique.

La présence presque exclusive du glycuconjugué de la thyroxine (T_4), dans les métabolites biliaires de cette hormone (205), permettait de penser que sa sulfoconjugaison éventuelle ne pouvait intervenir que sur une fraction infime du produit et dès lors était de peu d'intérêt, et pratiquement impossible à démontrer dans l'état actuel de nos possibilités. Quant aux deux autres hormones non encore envisagées à savoir la 3,3'-diiodo-L-thyronine (T_2) et la 3,3',5'-triiodo-L-thyronine (T'_3), leur catabolisme par déshalogénéation est tellement rapide (35, 174, 179, 195) qu'il paraissait très difficile d'espérer pouvoir mettre en évidence dans leurs dérivés biliaires un sulfoconjugué éventuel. Par ailleurs, le rôle biologique de ces deux hormones est encore mal précisé. Nous avons donc renoncé à cette recherche.

Ces considérations concernant le métabolisme de T_4 , T_2 et T'_3 constituaient des raisons supplémentaires pour orienter exclusivement nos recherches sur la conjugaison sulfurique de T_3 et de TA_3 .

Nous avons tout d'abord mis au point une technique de microsynthèse des esters sulfuriques de T_3 (ST_3) et de TA_3 (STA_3), corps qui

n'avaient pas encore été préparés et qui devaient nous servir de référence dans l'analyse des produits biologiques. Nous avons étudié certaines de leurs propriétés chromatographiques et électrophorétiques. Cette étude nous a permis d'établir une méthode analytique en vue de leur séparation d'avec les autres métabolites connus de T_3 et de TA_3 . Elle consiste essentiellement en un fractionnement progressif des constituants de l'échantillon à analyser, fractionnement effectué par électrophorèse suivie de plusieurs chromatographies préparatives successives dans des solvants différents. A chaque opération, on élue le ou les produits au même R_f que l'ester sulfurique de référence, jusqu'à l'obtention d'un corps pur qui est alors étudié.

De cette manière nous avons identifié ST_3 dans la bile du Rat traité par une dose physiologique de $T_3(3'-^{131}I)$. Il constitue un des métabolites marqués principaux de cette sécrétion avec d'autres dérivés antérieurement caractérisés à savoir GT_3 (156) et TK_3 (158). Il est accompagné de petites quantités d'iodure, de produits non encore identifiés et d'un taux variable de la molécule injectée (156). Chez ces mêmes animaux nous avons montré que les deux constituants marqués les plus abondants du plasma étaient $T_3(3'-^{131}I)$ et $ST_3(3'-^{131}I)$.

Après l'injection de doses physiologiques de $TA_3(3'-^{131}I)$ la bile renferme à côté de quelques pour-cents d'iodure, divers produits organiques : TA_3 en faible quantité, GTA_3 précédemment caractérisé (176) et d'autres métabolites dont l'un abondant et que nous avons identifié à $STA_3(3'-^{131}I)$. Dans ces conditions expérimentales, deux produits marqués principaux circulent dans le sang, l'un est le produit administré, et nous avons établi que l'autre était $STA_3(3'-^{131}I)$; ils sont accompagnés d'une teneur faible en iodures et de deux autres produits marqués qui n'ont pas été caractérisés.

Après administration d'une dose toxique de T_3 ou de TA_3 , le glycuconjugué de ces substances hormonales devient le produit biliaire principal mais dans ces conditions ce conjugué ne semble cependant pas apparaître dans le sang circulant, ou du moins en quantité importante.

Dans l'urine des animaux traités par $T_4(3'-^{131}I)$ ou $T_3(3'-^{131}I)$, on savait que la radioactivité revient pour plus de 75 % à $^{131}I^-$ (56), ce qui signifie que les dérivés organiques de ces hormones et entre autre les conjugués sont éliminés en quantité négligeable par cette voie. Nous avons établi qu'il en était de même après injection de $TA_3(3'-^{131}I)$. Dans ce cas, nous avons par ailleurs montré que la fraction organique marquée des urines renferme $GTA_3(3'-^{131}I)$ et $STA_3(3'-^{131}I)$ mais uniquement à l'état de traces.

Ces recherches ont donc démontré l'existence d'une sulfoconjugaison de T_3 et de TA_3 . Elles ont, par ailleurs précisé certaines modalités la distinguant de la glycuconjugaison. En effet, T_4 est essentiellement conjugué avec l'acide glycuronique, tandis que T_3 et TA_3 subissent cette même conjugaison mais aussi celle avec l'acide sulfurique. Dans des conditions physiologiques, la glycuconjugaison de ces substances est moins importante que la sulfoconjugaison mais nous avons observé l'inverse après leur administration à doses toxiques. Par ailleurs,

les glycuconjugués, GT_4 et GT_3 n'existent pas ou pratiquement pas, dans le sang circulant lorsque les voies biliaires sont perméables (156) et nous avons constaté qu'il en était de même pour GTA_3 . ST_3 et STA_3 , par contre, y circulent en quantité importante dans des conditions normales. Ces différences suggéreraient un rôle biologique particulier pour chacun de ces deux types de conjugués. Or des travaux antérieurs sur le métabolisme de GT_4 (15, 17) avaient autorisé à conclure que la glycuconjugaison de la thyroxine était un processus de détoxication réglant l'hormonémie avec économie d'hormone grâce à une circulation entérohépatique (205). Par ailleurs, bien qu'une étude semblable n'ait pas été faite avec GT_3 et GTA_3 , certains faits autorisent à leur attribuer la même signification biologique. On a montré par exemple que le taux de l'excrétion biliaire de GT_3 était fonction de la dose de T_3 administrée (156) et nous avons observé un phénomène analogue avec GTA_3 . Ainsi que GT_4 , GT_3 n'apparaît pas normalement dans le sang (156) et nous avons vu qu'il en était de même pour GTA_3 . La glycuconjugaison des substances hormonales thyroïdiennes est donc essentiellement un processus de détoxication. (Fig. 39).

La sulfoconjugaison intervenant de manière importante même après l'administration de doses physiologiques de T_3 ou de TA_3 , et les produits de celle-ci apparaissant normalement dans le sang, suggéreraient une signification biologique différente pour cette voie métabolique. Ce problème a été abordé par l'étude du comportement de $ST_3(3'-^{131}I)$ dans l'organisme.

Nous avons montré qu'à la différence du glycuconjugué, le sulfoconjugué n'était pas éliminé préférentiellement à son précurseur hormonal. Nous avons établi qu'il donnait lieu à une circulation entérohépatique principalement par résorption de ST_3 lui-même, sans exclure celle de T_3 résultant de son hydrolyse bactérienne possible. Contrairement à GT_3 , il existe dans le sang périphérique en quantité importante et dès lors on pouvait envisager son utilisation par les tissus et se demander s'il ne représentait pas une forme de transport ou une forme immédiatement active de l'hormone. Apparemment en faveur de cette hypothèse, nous avons montré que ST_3 était en partie métabolisé par déshalogénéation et par hydrolyse de sa fonction ester ce qui démontrait son utilisation par l'organisme.

En fait cette conception n'a pu être retenue. Nous avons en effet montré que l'estérification sulfurique de T_3 avait pour effet de ralentir la diffusion extravasculaire de l'hormone et sa pénétration cellulaire, sans doute en raison de la stabilité plus grande de la liaison de ST_3 aux protéines plasmatiques. Nous avons été amené à conclure que ST_3 était métabolisé principalement par le foie mais nous ne pouvons cependant exclure la possibilité de son utilisation par d'autres tissus. Dans cet organe il est entre autre hydrolysé avec libération de l'hormone triiodée (Fig. 39).

Dans l'état actuel de nos possibilités, une étude parallèle n'a pu être réalisée avec STA_3 , mais il nous paraît raisonnable de supposer qu'il a un comportement semblable à celui de ST_3 en raison de sa présence, comme ce dernier, dans le sang et parce que chez les animaux traités par TA_3 une faible partie seulement des produits biliai-

res est éliminée par les fèces (173) ce qui suppose leur résorption partielle par l'intestin. Or, nous avons établi que STA_3 était un des constituants principaux de la bile.

L'ensemble de notre travail nous autorise à conclure que la sulfoconjugaison est un mode de régulation de l'hormonémie assuré principalement sans doute par le foie et intéressant T_3 et TA_3 . Cette régulation s'effectue avec une économie de substance hormonale grâce à une circulation entérohépatique et à une mise en réserve de précurseurs de celle-ci surtout dans le sang sous forme de ST_3 ou de STA_3 . Ceux-ci régénèrent partiellement et progressivement leur précurseur biologique par hydrolyse hépatique et peut être intestinale (Fig. 39). La thyroïde agit sur l'ensemble de l'organisme non seulement - ainsi que d'autres endocrines d'ailleurs - par la sécrétion de plusieurs hormones, mais aussi par certains de leurs métabolites naturels (70, 214). On conçoit dès lors la complexité de la régulation de cette fonction. Elle est assurée d'une part par la glande antehypophysaire qui secrète entre autres une hormone thyroéostimulante laquelle contrôle la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes (13, 121, 125, 142, 151, 208, 210, 211), d'autre part par les reins qui règlent l'iodurémie indispensable à leur synthèse, et enfin par le foie qui métabolise intensément ces hormones par déshalogénéation, par désamination oxydative et par conjugaison avec l'acide glycuronique ou l'acide sulfurique. La fonction hépatique apparaît comme essentielle dans la régulation hormonale et sans doute faut-il en tenir compte en pathologie thyroïdienne.

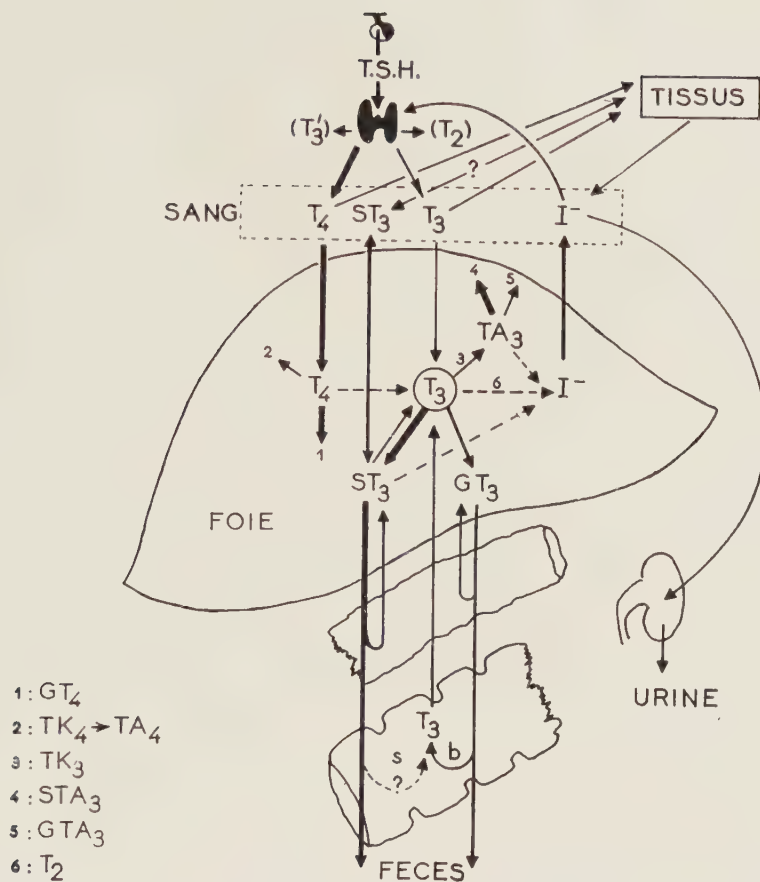


FIGURE 39.

Schéma illustrant le métabolisme de l'ester sulfurique de T_3 (ST_3) et l'intégrant dans celui des hormones thyroïdiennes, T_4 et T_3 principalement.

s : Sulfatases bactériennes.

b : β -glycuronidases bactériennes.

RESUME

La thyroïde sécrète quatre hormones, iodothyronines plus ou moins halogénées et principalement la 3,5,3',5'-tétraiodo-L-thyronine ou thyroxine (T_4) et la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3). Leurs propriétés biologiques ne se manifestant que plusieurs heures après leur administration, on a été amené à considérer que par elles-mêmes ces hormones étaient inactives et qu'un dérivé commun de celles-ci agissait directement au niveau cellulaire.

Diverses étapes de leur métabolisme étaient connues : désioduration progressive, désamination et décarboxylation oxydatives de la chaîne alanyl et conjugaison de l'hydroxyle phénolique avec l'acide glycuronique. Parmi les produits de ce métabolisme, deux dérivés de T_4 , présentent une importance primordiale, à savoir : T_3 et son métabolite naturel l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA_3) lui-même doué d'activités hormonales. Il était donc intéressant de poursuivre l'étude du métabolisme de ces derniers or, dans celui-ci, la sulfoconjugaison était possible : l'objet de notre travail a été de la démontrer et d'en préciser la signification biologique. Il comporte trois parties, l'une relative à la sulfoconjugaison de T_3 , l'autre à celle de TA_3 et la dernière à l'étude du métabolisme de l'ester sulfurique de T_3 (ST_3).

Première partie

1°) Nous avons réalisé une microsynthèse de ST_3 (produit non encore préparé) par action directe à froid de SO_4H_2 concentré sur T_3 et sur $T_3(3'-^{131}I)$ secs (réaction décrite par Reitz, Ferrel, Fraekel-Conrad et Olcott en 1946, pour la préparation de l'ester sulfurique de la tyrosine), suivie de la neutralisation de l'acide, et de la séparation chromatographique des produits de la réaction. Le composé isolé a été identifié à ST_3 en établissant que son OH phénolique était bloqué, que sa fonction amine était libre et que son hydrolyse acide ménagée régénérerait T_3 et SO_4^{2-} . Les propriétés chromatographiques et ionophorétiques de ST_3 ont été étudiées et nous ont permis d'élaborer une méthode analytique en vue de son identification éventuelle dans les humeurs comme métabolite de T_3 .

2°) Nous avons administré à des rats thyroïdectomisés, $^{35}SO_4Na_2$ (traceur) et $T_3(3'-^{131}I)$ à doses physiologiques ou non. Les composés radioactifs organiques et minéraux de la bile de ces animaux ont été séparés les uns des autres par électrophorèse préparative. L'éluat des premiers a été analysé par chromatographie préparative en n-BuOH saturé par NH_4OH 2 N suivie de l'élution des dérivés marqués au R_f de ST_3 de synthèse utilisé comme corps de référence. Des produits de ce second éluat, nous avons extrait par deux autres chromatographies pré-

paratives successives (respectivement en n-BuOH/AcOH/H₂O et MeOH/AcONH₄ 0,2 M) avec élution des produits radioactifs au R_f de ST₃, un métabolite abondant de T₃ marqué simultanément par ¹³¹I et ³⁵S. Ce métabolite possédait la même migration électrophorétique que ST₃ auquel il a été identifié par la concordance des R_f dans huit solvants différents. Après hydrolyse acide ménagée, il régénère T₃(3'-¹³¹I) et ³⁵SO₄⁼ : il s'agissait donc de T₃(3'-¹³¹I)(³⁵SO₃H-).

Chez les animaux traités par une dose physiologique (# 1 µg) d'hormone marquée, le rapport ³⁵S/¹³¹I de l'ester sulfurique biologique de celle-ci est très faible (# 1/100) mais il devient supérieur à l'unité chez ceux injectés d'une dose pharmacologique.

3°) D'une manière semblable, nous avons établi que ST₃ était le métabolite principal du plasma chez des rats traités par une dose physiologique de l'hormone triiodée T₃.

Dans ces mêmes conditions expérimentales, le glycuconjugué de l'hormone (GT₃) est déversé dans la bile en faible quantité et n'apparaît pas dans le sang lorsque les voies biliaires sont perméables, ce qui implique pour ce conjugué une destinée différente de celle du premier.

Deuxième partie

1°) La méthode décrite ci-dessus pour la préparation et la caractérisation de ST₃ nous a permis d'obtenir l'ester sulfurique de TA₃(3'-¹³¹I), STA₃(3'-¹³¹I), corps dont la synthèse n'avait pas encore été réalisée. Ses propriétés chromatographiques et électrophorétiques ont été mises à profit pour sa recherche dans les produits du métabolisme de TA₃.

2°) Par une expérimentation et une étude analytique similaires à celles utilisées pour l'identification de ST₃ en tant que métabolite naturel de T₃, nous avons établi que TA₃ subissait aussi une sulfoconjugaison même après administration à dose physiologique et que le produit de celle-ci surtout abondant dans la bile se retrouvait normalement dans le sang (3°) et n'apparaissait qu'à l'état de traces dans les urines (4°). Nous avons également montré que les autres produits urinaires marqués du métabolisme de TA₃(3'-¹³¹I) se composaient principalement de ¹³¹I⁻ accompagnés de la molécule injectée et de son glycuconjugué, l'une et l'autre en infime quantité.

Le glycuconjugué GTA₃ n'apparaît en proportion importante dans la bile qu'après injection d'une dose élevée de TA₃ et ne circule qu'à l'état de trace dans le sang. TA₃, dérivé à activités hormonales, est donc métabolisé de manière absolument semblable à son précurseur naturel T₃.

Troisième partie

Nous avons donc démontré l'existence d'une nouvelle voie métaboliques des hormones thyroïdiennes, la sulfoconjugaison, et son intervention dans des conditions physiologiques, ce qui suggérerait pour ces esters sulfuriques un rôle biologique différent de celui de simples produits de détoxication. Il avait été récemment observé que la sulfoconjugaison des phénols biologiquement actifs et celle des phénols toxiques paraissaient avoir des significations différentes et par ailleurs, l'attention avait été attirée sur l'existence possible de substrats biologiques pour les arylsulfatases des mammifères. Dans le but de vérifier ces hypothèses, nous avons étudié certains aspects du métabolisme de ST_3 et ce, comparativement à celui de l'hormone de T_3 son précurseur. Chez des rats thyroïdoprives traités par administration veineuse de l'une et l'autre de ces molécules marquées en 3' par ^{131}I , nous avons montré :

1°) que ST_3 n'est pas excrété plus rapidement que T_3 et que sa diffusion extravasculaire est plus lente que celle de l'hormone;

2°) que ST_3 de même que T_3 , n'est pas libre dans le sang, mais lié aux protéines plasmatiques : les albumines transportent l'ester sulfurique, quant à l'hormone, elle est essentiellement fixée par une α -globuline.

ST_3 n'est pas excrété tel que, mais est partiellement métabolisé par déshalogénéation et par hydrolyse de sa fonction ester ainsi qu'en témoignent l'apparition de $^{131}I^-$ dans les urines et celle du glycu-roconjugué $GT_3(3'-^{131}I)$ dans la bile d'animaux thyroïdoprives traités par $ST_3(3'-^{131}I)$.

3°) ST_3 est fixé en quantité beaucoup plus faible que T_3 par les tissus (en particulier le foie, les muscles et les surrénales) et est métabolisé - principalement dans le foie - plus lentement que l'hormone.

4°) Administré par voie duodénale, l'ester sulfurique de même que l'hormone n'est pas excrété en totalité avec les fèces : le tiers environ en est résorbé par l'épithélium digestif. Au même titre que les glycu-roconjugés des iodothyronines, ST_3 participe donc à la circulation entéro-hépatique des hormones thyroïdiennes.

En conclusion, la sulfoconjugaison de T_3 n'est pas un simple processus de détoxication inactivant un excès d'hormone et en facilitant l'élimination. Elle intervient en effet dans des conditions physiologiques, son produit n'est pas excrété plus rapidement que l'hormone et est en partie utilisé par l'organisme. ST_3 constitue une réserve - entre autre sanguine - de précurseur hormonal, T_3 étant restitué par une hydrolyse (tissulaire ou bactérienne) progressive.

En raisonnant par analogie, nous croyons pouvoir attribuer un rôle biologique semblable à l'ester sulfurique de TA_3 . La sulfoconjugaison apparaît dès lors avoir une signification différente de la glycu-roconjugaison, laquelle représente essentiellement un processus de détoxication régulateur de l'hormonémie.

B I B L I O G R A P H I E

1. ALBERT A., KEATING F.B. *Endocrinol.*, 51, 427 (1952).
2. ALBRIGHT E.C., LARSON F.C. and TUST R.H. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 86, 137 (1954).
3. ALBRIGHT E.C. and LARSON F.C. *Am. Goiter Assoc. Ann. Meeting-Abstr.* n° 13 (1955).
4. ALBRIGHT E.C., LARSON F.C., TOMITA K. and LARDY H.A. *Endocrinol.*, 59, 252 (1956).
5. ARSDEL P. (Van), HOGNESS J.R., WILLIAMS R.H. and ELGEE N. *Endocrinol.*, 55, 332 (1954).
6. BARAC G., BRULL L., TYBECK H. et NIZET A. *C.R. Soc. Biol.*, 148, 1510, (1954).
7. BARKER S.B. *Brookhaven Symp. Biol.*, 7, 74 (1955).
8. BARKER S.B. *Endocrinol.*, 59, 548 (1956).
9. BAUMANN E. *Ztschr. Physiol. Chem.*, 22, 1 (1895).
10. BETTELHEIM F.R.: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 2838 (1954).
11. BOAS N.F., FOLEY J.B. *Endocrinol.*, 56, 474 (1955).
12. BOLLING G.D., SOBER H.A., BLOCK A.J. *Féd. Proc.*, 8, 185 (1919).
13. BOTKIN A.L., ESKELSON C.D., FIRSHEIM H.E., JENSEN H.: *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 14, 1210 (1956).
14. BOWDEN C.H.W., MACLAGAN N.F., WILKINSON J.H. *Biochem. J.*, 59, 93 (1955).
15. BRIGGS F.N., TAUROG A., CHAIKOFF J.L. *Endocrinol.*, 50, 374 (1952).
16. BRIGGS F.N., BRAVER R.W., TAUROG A., CHAIKOFF I.L. *Am. J. Physiol.*, 172, 561 (1953).
17. BRIGGS F.N., TAUROG A., CHAIKOFF I.L. *Endocrinol.*, 52, 559 (1953).
18. BRUCE H.M., PITT-RIVERS R., SLOVITER H.A.: *J. Endocrinol. and Metab.*, 10, 340 (1954).
19. BRUCE Th.C., KHARASCH N., WINZLER R.J. *Arch. Biol. and Bio-phys.*, 62, 305 (1956).
20. BURMA D.P. *Anal. Chim. Acta*, 2, 513 (1953).
21. BURMA D.P. *Anal. Chem.*, 25, 549 (1953).
22. CHAIKOFF I.L. and TAUROG A. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 50, 377 (1949).
23. COURRIER R., ROCHE J., MICHEL O., MICHEL R. et COLONGE R.A. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 37, 439 (1955).

24. CONSDEN R., GORDON A.H., MARTIN A.J.P. Biochem. J., 38, 224 (1944).
25. DEISS W.P., ALBRIGHT E.C. and LARSON F.C. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 84, 513 (1953).
26. DE MEIO R.H., WIZERKANIUK M., SCHREIBMAN I. J. Biol. Chem., 213, 439 (1955).
27. DE MEIO R.H., WIZERKANIUK M. Biochim. Biophys. Acta, 20, 428 (1956).
28. DERRIEN Y., MICHEL R., ROCHE J. Biochim. Biophys. Acta, 2, 454 (1948).
29. DERRIEN Y., MICHEL R., ROCHE J. Biochim. Biophys. Acta, 3, 436 (1949).
30. DICKENS F., SALMONY D. Biochem. J., 64, 645 (1956).
31. DINGLELINE W.X., PITT-RIVERS R., STANBURY J.B. J. Clin. Endocrinol. and Metab., 15, 724 (1955).
32. DODGSON K.S. Coll. Intern. Biochim. du Soufre - ROSCOFF (Ed. C.N.R.S.) P. 123 (1956).
33. DONHOFFER S.Z., VARNAI I. and SZIEBERT-HORVATH E. Nature, 181, 346 (1958).
34. DUNCAN C.H., BEST M.M. Endocrinol., 63, 169 (1958).
35. DUNN J.T. and STANBURY J.B. J. Clin. Endocrinol. and Metab., 18, 713 (1958).
36. FINK K. and KINK R.M. Science, 108, 358 (1948).
37. FLETCHER K. Biochem. J., 67, 140 (1957).
38. FLOCK E.V., BOLLMAN J.L.: J. Biol. Chem., 214, 709 (1955).
39. FLOCK E.V., BOLLMAN J.L., GRINDLAY J.H., ORVIS A.L. Am. J. Physiol., 187, 407 (1956).
40. FLOCK E.V., BOLLMAN J.L., GRINDLAY J.H., Mc KENZIE B.F. Endocrinol., 61, 461 (1957).
41. FLOCK E.V., BOLLMAN J.L. and GRINDLAY J.H. Féd. Proc., 17, 221 (1958).
42. FISHER R.A. Statistical methods for research Workers. trad. française : Les méthodes statistiques adaptées à la recherche scientifique. Edit. P.U.F. Paris 1947.
43. FORD D.H., COREY K.R. and GROSS J. Endocrinol., 61, 426 (1957).
44. FORD D.H., GROSS J. Endocrinol., 62, 416 (1958).
45. FROMAGEOT C., JUTISZ M., TESSIER P. Bull. Soc. Chim. Biol., 31, 689 (1949).
46. GORDON A.H., GROSS J., O'CONNOR C., PITT-RIVERS R. Nature, 169, 19 (1952).
47. GRAD B., HOFFMAN M.M. Am. J. Physiol., 182, 487 (1955).

48. GRAEFF J. (de), WICHT C.L., QUERIDO A.: J. Clin. Endocrinol. and Metab., 17, 328 (1957).
49. GREENE R., MORGAN D.C., BIRD R.: J. Clin. Endocrinol. and Metab., 18, 99 (1958).
50. GROSS J. and LEBLOND C.P.: J. Biol. Chem., 171, 309 (1947).
51. GROSS J., LEBLOND C.P., FRANKLIN A.E. and QUASTEL J.H. Science, 111, 605 (1950).
52. GROSS J. and LEBLOND C.P. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 76, 686 (1951).
53. GROSS J. and PITT-RIVERS R. Lancet, 262, 439 (1952).
54. GROSS J., PITT-RIVERS R. and THIBAUT O. C.R. Soc. Biol., 147, 75 (1953).
55. GROSS J., PITT-RIVERS R. Biochem. J., 53, 645 (1953).
56. GROSS J. Brookhaven Symp. Biol., 7, 102 (1955).
57. GROSS J., FORD D.F., SYMCHOWIEZ S., HORTON J.H. Coll. on Endocrinol. Ciba Foundation, 10, 182 (1956).
58. HAMILTON J.G., SOLEY M.H. Am. J. Physiol., 127, 557 (1939).
59. HANAHAN D.J., EVERETT N.B.: J. Biol. Chem., 185, 919 (1950).
60. HARRINGTON C.R. Biochem. J., 20, 293 (1926).
61. HARRINGTON C.R. Biochem. J., 20, 300 (1926).
62. HARRINGTON C.R. and BARGER G. Biochem. J., 21, 169 (1927).
63. HARRINGTON C.R. and RANDALL S.S. Biochem. J., 23, 373 (1929).
64. HARRINGTON C.R. and SALTER W.T. Biochem. J., 24, 456 (1930).
65. HARRINGTON C.R. and RANDALL S.S. Biochem. J., 25, 1031 (1931).
66. HARRINGTON C.R. Erbebn. Physiol. u. Exp. Pharmokol., 37, 210 (1935).
67. HARRINGTON C.R. Lancet, 1, 1261 (1935).
68. HARRINGTON C.R.: J. Chem. Soc., 193, (1944).
69. HARRINGTON C.R. Endocrinol., 49, 401 (1951).
70. HARRINGTON C.R. and THIBAUT O.: C.R. Soc. Biol., 147, 78 (1953).
71. HARRINGTON C.R., PITT-RIVERS R., QUERIDO A., ROCHE J., TAUROG A. Nature, 179, 218 (1957).
72. HEIDELBERGER M.: J. Biol. Chem., 101, 433 (1933).
73. HERTS S., ROBERTS A., EVANS R.D. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 38, 510 (1938).
74. HAWKINS J.B., YOUNG L.: J. Biol. Chem., 56, 166 (1954).
75. HOOGWINKEL G.J.M., SMITS G., KROOM D.B. Biochim. Biophys. Acta, 15, 78 (1954).

76. INGBAR S.H., FREINKEL N. Endocrinol., 61, 398 (1957).
77. INGBAR S.H., Endocrinol., 63, 256 (1958).
78. ISSELBACHER K.J. Recent Progress in Hormones Research. Acad. Press N.Y., 12, 134 (1956).
79. JAYLE M.F. Thérapie, 13, 37 (1958).
80. JOLIOT-CURIE F., COURRIER R., POUMEAU-DELILLE G. et SUE P. C.R. Soc. Biol., 139, 278 (1944).
81. JOLIOT-CURIE F., COURRIER R., HOREAU A. et SUE P.: C.R. Acad. Sc., 218, 769 (1944).
82. KALLANT H., SELLERS E.A. and LEE R.B. Fed. Proc., 13, 76 (1954).
83. KEATING R.F. and ALBERT A.: J. Clin. Invest., 32, 580 (1953).
84. KENDALL E.C.: J. Am. Med. Assoc., 64, 2042 (1915).
85. KENDALL E.C. Trans. Assoc. Am. Physicians, 30, 420 (1915).
86. KENDALL E.C. Endocrinol., 3, 156 (1919).
87. KENDALL E.C.: J. Biol. Chem., 39, 125 (1919).
88. KENDALL E.C. Ind. Eng. Chem., 17, 525 (1925).
89. KESTON A.: J. Biol. Chem., 153, 335 (1944).
90. KLEEMAN C.R., TABORSKY E., EPSTEIN F. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 91, 480 (1956).
91. KLITGAARD H.M., LIJNER H.J., BARKER S.B., WINNICK T. Endocrinol., 52, 79 (1953).
92. KLITGAARD H.M., TOTH J.P., KOT P.A., WHALEY R. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 96, 122 (1957).
93. LACOMBE G., MICHEL R.: C.R. Soc. Biol., 149, 888 (1955).
94. LAIDLAW J.C. Nature, 164, 927 (1949).
95. LARDY H., TOMITA K., LARSON F.C. and ALBRIGHT E.C. Ciba Foundation Coll. on Endocrinol. London, 10, 156 (1957).
96. LARSON F.C., DEISS N.P., ALBRIGHT E.C.: J. Clin. Invest., 33, 230 (1954).
97. LARSON F.C., TOMITA K. and ALBRIGHT E.C. Endocrinol., 57, 338 (1955).
98. LARSON F.C., ALBRIGHT E.C. Endocrinol., 56, 737 (1955).
99. LARSON F.C., ALBRIGHT E.C. Endocrinol., 63, 183 (1958).
100. LASSITER W., STANBURY J.B.: J. Clin. Endocrinol. and Metab., 18, 903 (1958).
101. LEBLOND C.P., SUE P.: C.R. Soc. Biol., 133, 543 (1940).
102. LEBLOND C.P. and SUE P. Am. J. Physiol., 134, 549 (1941).
103. LEBLOND C.P.: J. Am. Pharm. Assoc., 40, n° 12 (1951).

104. LERMAN J., HARINGTON C.R., MEANS J.H.: J. Clin. Endocrinol., 12, 1306 (1952).
105. LERMAN J.: J. Clin. Endocrinol. and Metab., 13, 1341 (1953).
106. LERMAN J., PITT-RIVERS R.: J. Clin. Endocrinol., 15, 653 (1955).
107. LIPPMAN R.W. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 66, 188 (1947).
108. LISSITZKY S., BOUCHILLOUX S. Ciba Foundation Coll. on Endocrinol. London, 10, 195 (1957).
109. LUDWIG W. and VON MUTZENBECHER P. Zeitschr. f. Physiol. Chem., 258, 195 (1939).
110. MACLAGAN N.F. and SPROTT N.E. Lancet, 2, 368 (1954).
111. MACLAGAN N.F., REID D. Ciba Foundation Coll. on Endocrinol., 10, 190 (1957).
112. MAN E.B., SMIRNOW A.E., GILDEA E.F., PETERS J.P.: J. Clin. Invest., 21, 773 (1942).
113. MAN E.B., KYDD D.M., PETERS J.P.: J. Clin. Invest., 30, 531 (1951).
114. MANCINI R.E., GARBERI J.C., DE LA BALZE F.A. Rev. Soc. Argentine Biol., 27, 285 (1951).
115. MICHEL R. Aspects actuels de la Biochimie thyroïdienne, II^e Congrès Intern. Biochim. Symp. Hormones Protéiques. Paris, 1952 (Ed. Masson).
116. MICHEL R. Annual Review of Physiology, 18, 457 (1956).
117. MICHEL R., PITT-RIVERS R. Biochim. Biophys. Acta, 24, 213 (1957).
118. MICHEL R., TRUCHOT R., TRON-LOISEL H.: C.R. Soc. Biol. (sous presse) (1958).
119. MOORE S., STEIN W.H.: J. Biol. Chem., 211, 907 (1954).
120. MOREL F. Thèse Fac. Sc. Univ. Paris. A, n° 2713 n° d'ordre 3586. 1954 (Ed. Bull. Soc. Biol. Paris).
121. MORTON M.E., PERLMAN I., ANDERSON E. and CHAIKOFF I.L. Endocrinol., 30, 495 (1942).
122. MUSTACCHI P., PETERMANN M.L., RALL J.E.: J. Clin. Endocrinol. and Metab., 14, 729 (1954).
123. MUTZENBECHER P. (von). Zeitschr. f. Physiol. Chem., 261, 253 (1939).
124. OSWALD A. Zeitschr. f. Physiol. Chem., 27, 14 (1899).
125. PAVLOVIC M.: J. Endocrinol., 12, 227 (1955).
126. PERLMAN I., MORTON M.E. and CHAIKOFF I.L.: J. Biol. Chem., 139, 449 (1943).
127. PITT-RIVERS R. Biochem. J., 43, 293 (1948).
128. PITT-RIVERS R. J. Clin. Endocrinol. and Metab., 14, 1444 (1954).
129. PITT-RIVERS R., THIBAUT O.: C.R. Acad. Sc., 240, 668 (1955).

130. RALL J.E., ROBBINS J., BECKER O. and RAWSON R.W.: J.Clin. Invest., 32, 596 (1953).
131. RAPPORT R.L., CURTIS G.M.: J. Clin. Endocrinol. and Metab., 10, 735 (1950).
132. RAWSON R.W., RALL J.E., PEARSON O.H., ROBBINS J., POPPEL H.F. and WEST C.D. Am. J. Med. Sc., 226, 405 (1953).
133. REINEKE E.P. Ann. N.Y. Acad. Sc., 50, 450 (1949).
134. REINEKE E.P., SINGH O.N. Proc. Soc. for Exp. Biol. and Med., 88, 203 (1955).
135. REINHARDT W.O., CHON HAOLI Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 58, 321 (1945).
136. REITZ H.C., FERREL R.E., FRAENKEL-CONRADT H. and OLCOTT S.: J. Am. Chem. Soc., 68, 1024 (1946).
137. RICH C., BEARN A.G. Endocrinol., 62, 687 (1958).
138. ROBBINS J., RALL J.E.: J. Clin. Endocrinol. and Metab., 14, 772 (1954).
139. ROBBINS J., PETERMANN M.L., RALL J.E.: J. Biol. Chem., 212, 403 (1955).
140. ROBBINS J., RALL J.E.: J. Clin. Invest., 34, 1331 (1955).
141. ROBBINS J., RALL J.E. Recent Progress in Hormone Research, 13, 161 (1957).
142. ROBERTIS E. (de) Anat. Rec., 80, 219 (1941).
143. ROBERTIS E. (de) Science), 103, 421 (1944).
144. ROBERTIS E. (de), NOWINSKI W.W.: J. Clin. Endocrinol., 6, 235 (1946).
145. ROCHE J., JUTISZ M., LISSITZKY S., MICHEL R.: C.R. Acad. Sc., 231, 723 (1950).
146. ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R. Biochim. Biophys. Acta, 8, 339 (1952).
147. ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R.: C.R. Acad. Sc., 234, 997 (1952).
148. ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R.: C.R. Acad. Sc., 234, 1228 et 2047 (1952).
149. ROCHE J., MICHEL R., MICHEL O., et LISSITZKY S. Biochim. Biophys. Acta, 2, 161 (1952).
150. ROCHE J., MICHEL R. et TATA J.: C.R. Soc. Biol., 146, 1003 (1952).
151. ROCHE J., MICHEL O., MICHEL R. et GORBMAN A.: C.R. Soc. Biol., 147, 234 (1953).
152. ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R. Biochim. Biophys. Acta, 11, 220 (1953).
153. ROCHE J., MICHEL R., TATA J. Biochim. Biophys. Acta, 11, 543 (1953).
154. ROCHE J., MICHEL R., TATA J.: C.R. Acad. Sc., 236, 1614 (1953).

155. ROCHE J., MICHEL R., LISSITZKY S., YAGI Y.: C.N.R.S. 143 à 157 (1954).
156. ROCHE J., MICHEL O., MICHEL R., TATA J. Biochim. Biophys. Acta, 13, 471 (1954).
157. ROCHE J., MICHEL R., VOLPERT E.: C.R.Soc. Biol., 148, 21 (1954).
158. ROCHE J., MICHEL R., TATA J.: C.R.Soc. Biol., 148, 642 (1954).
159. ROCHE J., MICHEL R., TATA J.: C.R.Soc. Biol., 148, 968 (1954).
160. ROCHE J., MICHEL R., TATA J.: C.R.Soc. Biol., 148, 1036 (1954).
161. ROCHE J., MICHEL R., TATA J.: C.R.Soc. Biol., 148, 1545 (1954).
162. ROCHE J., MICHEL R., WOLF W., ETLING N.: C.R.Soc. Biol., 148, 1738 (1954).
163. ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J., LACOMBE G. Bull. Soc. Chim. Biol., 37, 219 (1955).
164. ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J. Bull. Soc. Chim. Biol., 37, 229 (1955).
165. ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J. Bull. Soc. Chim. Biol., 37, 809 (1955).
166. ROCHE J., MICHEL R., JOUAN P., WOLF W. Bull. Soc. Chim. Biol., 37, 819 (1955).
167. ROCHE J., MICHEL R., WOLF W.: C.R.Acad. Sc., 240, 251 (1955).
168. ROCHE J., MICHEL R., WOLF W. et NUNEZ J.: C.R.Acad. Sc., 240, 921 (1955).
169. ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J., WOLF W. Biochim. Biophys. Acta, 18, 149 (1955).
170. ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J., WOLF W.: C.R.Soc. Biol., 149, 884 (1955).
171. ROCHE J., MICHEL R., WOLF W.: C.R.Soc. Biol., 149, 1604 (1955).
172. ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J.: C.R.Soc. Biol., 150, 20 (1956).
173. ROCHE J., MICHEL R., JOUAN P. et WOLF W. Endocrinol., 59, 425 (1956).
174. ROCHE J., MICHEL R., ETLING N., NUNEZ J.: C.R.Soc. Biol., 150, 464 (1956).
175. ROCHE J., MICHEL R., JOUAN P.: C.R.Soc. Biol., 150, 629 (1956).
176. ROCHE J., MICHEL R., ETLING N., JOUAN P.: C.R.Soc. Biol., 150, 1320 (1956).
177. ROCHE J., MICHEL R., CLOSON J. et MICHEL O.: C.R.Soc. Biol., 150, 2097 (1956).
178. ROCHE J., MICHEL R., ETLING N., NUNEZ J. Biochim. Biophys. Acta, 19, 490 (1956).
179. ROCHE J., MICHEL R., ETLING N., NUNEZ J. Biochim. Biophys. Acta, 22, 550 (1956).
180. ROCHE J., MICHEL R., TRUCHOT R., WOLF W., MICHEL O. Biochim. Biophys. Acta, 20, 337 (1956).

181. ROCHE J., MICHEL R., MICHEL O., ETLING N.: C.R. Acad. Sc., 245, 1089 (1957).
182. ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J., JACQUEMIN C.: C.R. Soc. Biol., 151, 2012 (1957).
183. ROCHE J., MICHEL R., WOLF W. Bull. Soc. Chim. Fr., 468 (1957).
184. ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J. Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 361, 368 (1958).
185. ROSENBERG I.N.: J. Clin. Invest., 30, 1, (1951).
186. ROY A.B. Coll. intern. Biochim. Soufre; ROSCOFF 1956 (Ed. C.N.R.S.) p. 143.
187. SALTER W.T. Physiol. Rev., 20, 345 (1940).
188. SALTER W.T., WHITE W.F., Mc KAY E.A. Fed. Proc., 5, 90 (1946).
189. SALTER W.T., JOHNSTON M.W.: J. Clin. Endocrinol., 8, 911 (1948).
190. SCHNEIDER J.J., LEWBART M.L.: J. Biol. Chem., 222, 787 (1956).
191. SCHMID K. J. Am. Chem. Soc., 75, 2532 (1953).
192. SPENCER B. Coll. Intern. Biochim. Soufre; ROSCOFF 1956 (Ed. C.N.R.S.) p. 135.
193. SPECTOR W.S. Handbook of Biological Data. Saunders Comp. Philadelphia and London (1956).
194. SPROTT W.E., MACLAGAN N.F. Biochem. J., 59, 288 (1955).
195. STANBURY J.B., MORRIS M.L.: J. Clin. Endocrinol. and Metab. 17, 1324 (1957).
196. STANBURY J.B., MORRIS M.L.: J. Biol. Chem., 233, 106 (1958).
197. TALLAN H.H., BELLA S.T., STEIN W.H., MOORE S.: J. Biol. Chem., 217, 703 (1955).
198. TATA J., RALL E., RAWSON R.W. Endocrinol., 60, 83 (1957).
199. TAUROG A. and CHAIKOFF I.L.: J. Biol. Chem., 176, 639 (1948).
200. TAUROG A., CHAIKOFF I.L. and TONG W.: J. Biol. Chem., 178, 997 (1949).
201. TAUROG A., TONG W. and CHAIKOFF I.L.: J. Biol. Chem., 184, 83 (1950).
202. TAUROG A., CHAIKOFF I.L., TONG W.: J. Biol. Chem., 184, 99 (1950).
203. TAUROG A., BRIGGS F.N. and CHAIKOFF I.L.: J. Biol. Chem., 191, 29 (1951).
204. TAUROG A., BRIGGS F.N. and CHAIKOFF I.L.: J. Biol. Chem., 194, 655 (1952).
205. TAUROG A., Brookhaven Symp. Biol., 7, 111 (1955).
206. TAUROG A., WHEAT J.D., CHAIKOFF I.L. Endocrinol., 58, 121 (1956).
207. TAUROG A., CHAIKOFF I.L. Methods in Enzymology, 4, 856 Acad. Press. Publishers N.Y. (1957).

208. TAUROG A., TONG W., CHAIKOFF I.L. Ciba Foundation Coll. Endocrinol., 10, 59 (1957).
209. TAUROG A., TONG W., CHAIKOFF I.L.: J. Biol. Chem., 227, 759 (1957).
210. TAUROG A., TONG W., CHAIKOFF I.L. Endocrinol., 62, 646 (1958).
211. TAUROG A., TONG W., CHAIKOFF I.L. Endocrinol., 62, 664 (1958).
212. THIBAUT O.: C.R. Soc. Biol., 149, 877 (1955).
213. THIBAUT O., PITT-RIVERS R.: C.R. Soc. Biol., 149, 880 (1955).
214. THIBAUT O. Ciba Foundation Coll. on Endocrinol. London, 10, 230 (1957).
215. TOMITA K., LARDY H.A.: J. Biol. Chem., 219, 595 (1956).
216. TOMITA K. Fed. Proc., 16, 400 (1957) Abstr. 1716
217. TONG W., TAUROG A., CHAIKOFF I.L.: J. Biol. Chem., 191, 665 (1951).
218. TONG W., TAUROG A., CHAIKOFF I.L.: J. Biol. Chem., 207, 59 (1954).
219. TROTTER W.R. Ciba Found. Coll. on Endocrinol. London, 10, 270 (1957).
220. UJESKI L., GLEGG R.E. Can. J. Biochem. Physiol., 33, 199 (1955).
221. VISSCHER M. (de), BECKERS Ch.: J. Physiol., 49, 439 (1957).
222. WILANSKY D.L., NEWSHAM L.G.S., HOFFMAN M.M. Endocrinol., 61, 327 (1957).
223. WILKINSON J.H. and MACLAGAN N.F.: J. Endocrinol. and Metab., 10, 15 (1954).
224. WILLIAMS R.D. Detoxication Mechanism. Chapman, London (1949).
225. ZYL A. (van) Endocrinol., 16, 213 (1957).

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	3
Objet du travail	8
Nomenclature	9
 <u>PREMIERE PARTIE</u>	
<u>SULFOCONJUGAISON DE LA 3,5,3'-TRIODO-L-THYRONINE (T_3)</u>	
 <u>CHAPITRE I - PREPARATION ET CARACTERISATION DE L'ESTER</u> <u>SULFURIQUE DE T_3 (ST_3)</u>	11
1. Estérification sulfurique de T_3	11
Mode opératoire	11
Séparation et analyse des produits de la réaction . . .	12
Discussion	13
Résumé	13
2. Préparation de $T_3(3'-^{131}I)$	14
Mode opératoire	
a) préparation du matériel	14
b) préparation des solutions	14
c) ioduration de 3,5- T_2	15
d) séparation des produits de la réaction	15
e) préparation de la solution de $T_3(3'-^{131}I)$. . .	15
f) rendement et activité spécifique	16
Discussion	16
Résumé	17
3. Estérification sulfurique de $T_3(3'-^{131}I)$	17
Mode opératoire	17
Séparation des produits de la réaction	18
Identification et caractérisation de $ST_3(3'-^{131}I)$. . .	18
Rendement et activité spécifique	20
Résumé	21
Conclusions	21
 <u>CHAPITRE II - IDENTIFICATION DE ST_3 DANS LA BILE DU RAT</u> <u>THYROIDECTOMISE TRAITE PAR T_3</u>	22
Mode opératoire	23
Synthèse des produits marqués	23

II

Mesures de radioactivité et autoradiographies	23
Expériences biologiques et analyses des produits biliaires .	24
Groupe I : injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$	24
Groupe II : injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2 + 1,2 \mu\text{g } \text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$	25
Groupe III : injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2 + 9 \text{ mg } \text{T}_3(3'-^{131}\text{I})$	27
Groupe IV : injection de $0,03 \mu\text{g } \text{T}_3(3'-^{131}\text{I})/100 \text{ g}$. .	27
Discussion	27
Résumé	29

CHAPITRE III - IDENTIFICATION DE ST_3 DANS LE PLASMA DU RAT THYROIDECTOMISE TRAITE PAR T_3 31

Mode opératoire	31
Analyse des produits extraits du plasma	32
Discussion	34
Résumé	35

CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE 35

DEUXIEME PARTIE

SULFOCONJUGAISON DE L'ACIDE 3,5,3'-TRIETHOXYTHYROACETIQUE (TA_3)

Introduction	39
------------------------	----

CHAPITRE I - PREPARATION ET CARACTERISATION DE L'ESTER SULFURIQUE DE TA_3 (STA_3) 41

1. Préparation de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$	41
2. Estérification sulfurique de $\text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$	41
Mode opératoire	42
Séparation des produits de la réaction	42
Identification et caractérisation de $\text{STA}_3(3'-^{131}\text{I})$. .	42
Rendement	43
Résumé	44

CHAPITRE II - IDENTIFICATION DE STA_3 DANS LA BILE DU RAT THYROIDECTOMISE TRAITE PAR TA_3 45

Mode opératoire	45
Expérience biologique et analyse des produits biliaires	46
Groupe I : injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2 + 0,1 \mu\text{g } \text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$	46
Discussion	47
Groupe II : injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2 + 10 \text{ mg } \text{TA}_3(3'-^{131}\text{I})$	47
Discussion	48
Résumé	49

III

CHAPITRE III - IDENTIFICATION DE STA₃ DANS LE PLASMA DU RAT THYROIDECTOMISE TRAITE PAR TA₃

Mode opératoire	50
Expérience I Rat en ictère aigu; injection de 3 ⁵ SO ₄ Na ₂ + 1 µg TA ₃ (3'- ¹³¹ I)	50
Expérience II Rat normal; injection de 3 ⁵ SO ₄ Na ₂ + 1 µg TA ₃ (3'- ¹³¹ I)	52
Expérience III Rat normal; injection de 3 ⁵ SO ₄ Na ₂ + 10 mg TA ₃	52
Discussion et conclusions	53
Résumé	54

CHAPITRE IV - NATURE DES METABOLITES URINAIRES CHEZ LE RAT THYROIDECTOMISE TRAITE PAR TA₃ , ET PARMI CEUX-CI, IDENTIFICATION DE STA₃

Introduction	56
Mode opératoire	56
Expérience I : injection de 3 ⁵ SO ₄ Na ₂ avec ou sans TA ₃ (10 mg)	57
Expérience II : injection de 0,45 µg et de 10 mg TA ₃ (3'- ¹³¹ I)	57
Expérience III : injection de 3 ⁵ SO ₄ Na ₂ + 10 mg TA ₃ (3'- ¹³¹ I)	58
Discussion	59
Résumé	60

<u>CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE</u>	61
--	----

TROISIEME PARTIE

METABOLISME DE L'ESTER SULFURIQUE DE T₃ (ST₃) CHEZ LE RAT THYROIDECTOMISE

Introduction	63
------------------------	----

CHAPITRE I - METABOLISME COMPARE DE ST₃ ET T₃ ADMINISTRES PAR VOIE VEINEUSE

Préparation de ST ₃ (3'- ¹³¹ I) et de T ₃ (3'- ¹³¹ I)	65
Excrétion urinaire et fécale	66
Discussion	66
Excrétion biliaire	68
Discussion	69
Résumé	70

CHAPITRE II - NATURE DES PRODUITS DU METABOLISME DE ST_3 ET
LIAISON DE CELUI-CI AVEC LES PROTEINES SERIQUES

Introduction	71
Nature des métabolites biliaires de $ST_3(3'-^{131}I)$	71
Nature des métabolites sanguins de $ST_3(3'-^{131}I)$	72
Discussion	73
Liaison de ST_3 aux protéines	74
Discussion	75
Conclusions	76
Résumé	76

CHAPITRE III - DISTRIBUTION TISSULAIRE COMPAREE DE ST_3 ET
DE T_3 ADMINISTRES PAR VOIE VEINEUSE

Mode opératoire	77
Résultats :	
Plasma	78
Foie	79
Muscles	79
Reins	79
Autres organes	80
Discussion	81
Résumé	83

CHAPITRE IV - EXCRETION ET DISTRIBUTION TISSULAIRE COMPAREE
DE ST_3 ET DE T_3 INJECTES DANS LE DUODENUM 85

Expérience I : Rat sacrifié 24 heures après le traitement .	85
Mode opératoire	85
Résultats	85
Expérience II : Rat sacrifié trois jours après le traitement	87
Résultats	87
Discussion	90
Résumé	90

CONCLUSIONS DE LA TROISIEME PARTIE 91

CONCLUSIONS GENERALES 93

RESUME 97

BIBLIOGRAPHIE 101

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

"La radio-protection des cellules vivantes par les
substances organiques".

Vu et approuvé :

Paris, le 20 avril 1959.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

Jean SARRAILH

Imprimerie DEROUAUX
Av. Pt Bourgogne, 34
- SCLESSIN - LIEGE -
Editions scientifiques



IMPRIMÉ EN BELGIQUE